



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

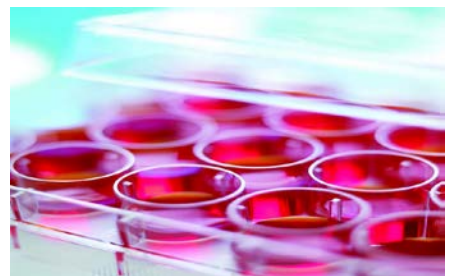
***Trabajo de Tesis Doctoral***

***EVALUACION DE AISLADO PROTEICO DE  
AMARANTO COMO FUENTE DE PEPTIDOS  
ANTIOXIDANTES: ESTUDIOS IN VITRO E IN VIVO***

***Lic. Susan Fiorella García Fillería***

***Dirección: Dra. Valeria Tironi***

**2019**



**El presente trabajo, para optar por el grado académico de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas, fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA- CONICET- UNLP-CIC, La Plata, Argentina) bajo la dirección de la Dra. Valeria Tironi**

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional de La Plata por la formación académica y personal brindada a lo largo de estos años.

Al CONICET por la beca otorgada que hizo posible la realización de este trabajo.

A Valeria por su compromiso, trabajo y paciencia.

A todos mis compañeros del laboratorio por la compañía y el apoyo, especialmente a la Dra María Cristina Añón.

A Agus y Mari por su ayuda.

A todo el personal del CIDCA por su colaboración.

A mis amigos por estar siempre.

A mi familia por su apoyo incondicional durante tantos años, especialmente a mis papás y a mi querida mamá vida.

## INDICE

<b>INTRODUCCIÓN GENERAL</b>	1
Alimentos funcionales.	2
Oxidación en sistemas biológicos.	4
Daño a biomoléculas	7
Defensas antioxidantes en el organismo	9
Estrés oxidativo y sus consecuencias	11
Antioxidantes dietarios	12
Péptidos bioactivos y antioxidantes de naturaleza proteica.	13
Amaranto	16
Proteínas y péptidos bioactivos de amaranto.	25
<b>OBJETIVOS GENERALES</b>	27
<b>PARTE I. ESTUDIOS <i>in vitro</i></b>	29
<b>CAPÍTULO 1. PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MUESTRAS. DIGESTIÓN GASTROINTESTINAL SIMULADA DE AISLADO PROTEICO DE AMARANTO</b>	30
<b>INTRODUCCIÓN</b>	31
Simulación <i>in vitro</i> de la digestión gastrointestinal	33
Bioinformática aplicada al estudio de péptidos bioactivos.	39
<b>OBJETIVOS</b>	41
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
1.1. Preparación de aislados proteicos de amaranto (A)	42
1.2. Simulación de la digestión gastrointestinal (Ad)	42
1.2.1. Protocolo 1 (Ad1): Método de nuestro laboratorio	42
1.2.2. Protocolo 2 (Ad2): Modificación del método internacionalmente consensuado	43
1.2.3. Protocolo 3 (Ad3): Método internacionalmente consensuado	43
1.3. Composición de las muestras	44
1.3.1. Hidratos de carbono: Método colorimétrico de antrona	44
1.3.2. Proteína total: Método de MicroKjeldahl	44
1.3.3. Agua: Método indirecto	44
1.3.4. Cenizas totales: incineración en mufla	44
1.3.5. Lípidos: Método de Soxhlet	44
1.4. Determinación del grado de hidrólisis proteica	45
1.5. Caracterización de la composición molecular por electroforesis	45
1.5.1. Electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	45
1.5.2. Electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida con tricina (tricina-SDS-PAGE)	46
1.6. Obtención y cuantificación de fracciones solubles.	46
1.7. Caracterización molecular y separación de las fracciones solubles mediante cromatografía de filtración molecular FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography).	47
1.7.1. Columna analítica	47
1.7.2. Columna semi-preparativa	48
1.8. Caracterización de péptidos derivados de digerido gastrointestinal de aislado de amaranto.	48
1.8.1. Análisis <i>in silico</i> de propiedades fisicoquímicas de los péptidos	49
1.8.2. Análisis <i>in silico</i> de la estructura de los péptidos y propiedades derivadas.	50
1.8.3. Análisis <i>in silico</i> de propiedades relacionadas con la interacción	50



péptido-célula	
1.9.    Actividad frente a radicales libres en sistemas in vitro químicos	51
1.9.1.    Ensayo ORAC (Oxygen Radical Absorption Capacity)	51
1.9.2.    Ensayo HORAC (Hydroxyl Radical Averting Capacity)	52
1.10.    Análisis estadístico.	53
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	54
1.A. <b>COMPARACIÓN DE MÉTODOS DE DIGESTIÓN GASTROINTESTINAL SIMULADA</b>	54
1.A.1.    Caracterización de los digeridos gastrointestinales	54
1.A.2.    Actividad de los digeridos y sus fracciones frente a radicales libres en sistemas químicos	61
1.B.    OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE FRACCIONES A PARTIR DE DIGERIDO GASTROINTESTINAL DE AISLADO DE AMARANTO (Ad).	67
1.B1.    Cromatografía de exclusión molecular FPLC	67
1.B2.    Actividad antioxidante de las fracciones en sistemas químicos.	69
1.C.    CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS DERIVADOS DE LA DIGESTIÓN GASTROINTESTINAL DE AISLADO DE AMARANTO	71
1.C.2.    Conformación de los péptidos y propiedades derivadas.	72
1.C.3.    Propiedades relacionadas con la interacción de los péptidos con células	82
1.C.4.    Actividad de los péptidos frente a radicales libres in sistemas químicos.	83
<b>CONCLUSION</b>	87
<b>CAPÍTULO 2. PREVENCIÓN DE LA OXIDACIÓN DE LAS LDL</b>	89
<b>INTRODUCCIÓN</b>	90
Lipoproteínas de baja densidad (LDL), oxidación y formación de la placa aterogénica	90
Antioxidantes, alimentación y oxidación de LDL	96
<b>OBJETIVOS</b>	99
<b>MATERIALES Y METODOS</b>	100
2.1.    Muestras proteicas	100
2.2.    Ensayo de inhibición de la oxidación de LDL	100
2.2.1.    Recolección de muestras de sangre	100
2.2.2.    Obtención de LDL	100
2.2.3.    Oxidación de LDL	100
2.3.    Monitoreo de la formación de dienos conjugados (CD)	101
2.4.    Determinación de las sustancias reactivas al ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS)	101
2.5.    Evolución de la fluorescencia	101
2.6.    Electroforesis en gel de agarosa	102
2.7.    Análisis estadístico	102
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	103
2.A. <b>EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE Ad</b>	103
2.A.1    Ensayos preliminares para la optimización de la oxidación de las LDL	103
2.A.2.    Evaluación de la actividad de Ad	105
2.B. <b>EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LAS FRACCIONES FPLC SEPARADAS A PARTIR DE Ad.</b>	109
2.C. <b>EVALUACIÓN DE LOS PÉPTIDOS SINTÉTICOS DERIVADOS DE Ad</b>	116
<b>CONCLUSIONES</b>	122

<b>CAPÍTULO 3. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE INTRACELULAR</b>	124
<b>INTRODUCCIÓN</b>	125
Estrés oxidativo intracelular	125
Daño celular por agentes oxidativos exógenos	129
Sistemas de defensa antioxidante celulares	129
Evaluación de la actividad antioxidante en cultivos celulares	133
<b>OBJETIVOS</b>	140
<b>MATERIALES Y METODOS</b>	141
3.1. Muestras proteicas	141
3.2. Cultivo de células Caco-2 TC7	141
3.2.1. Medios y reactivos utilizados para los cultivos celulares	141
3.2.2. Cultivo de las células Caco 2-TC7	141
3.3. Citotoxicidad de la muestras	142
3.3.1. Viabilidad celular por el método del rojo neutro	142
3.3.2. Viabilidad celular por determinación de la enzima lactato deshidrogenasa	143
3.3.3. Viabilidad celular por citometría de flujo	143
3.4. Inducción de la oxidación celular	146
3.5. Evaluación de la inhibición de ROS intracelulares	146
3.6. Evaluación de la prevención de la oxidación de lípidos	147
3.7. Efecto sobre la actividad de enzimas antioxidantes y contenido de GSH.	149
3.7.1. Actividad de superóxido dismutasa	150
3.7.2. Glutación Peroxidasa	150
3.7.3. Contenido de glutatión reducido	151
3.8. Evaluación de la prevención del daño en mitocondria y membrana celular por citometría de flujo.	152
3.9. Análisis estadístico	153
<b>RESULTADOS</b>	154
3.A. <b>EFFECTO DE Ad EN LA PREVENCIÓN DEL DAÑO OXIDATIVO INTRACELULAR</b>	154
3.A.1. Citotoxicidad de Ad	154
3.A.2. Efecto de Ad en el contenido de ROS intracelulares.	155
3.A.3. Efecto de Ad en la prevención de la oxidación de lípidos.	159
3.A.4. Efecto de Ad sobre la defensa antioxidante celular	163
3.A.4.1. Actividad de la SOD	163
3.A.4.2. Actividad de la GPx	165
3.A.4.3. Contenido de GSH intracelular	166
3.A.4.4. Daño en la membrana y mitocondria celulares.	167
3.B. <b>EFFECTO DE LAS FRACCIONES DE Ad SOBRE EL DAÑO OXIDATIVO INTRACELULAR</b>	171
3.B.1. Citotoxicidad de las fracciones de Ad	171
3.B.2. Evaluación del efecto de las fracciones de Ad en el contenido de ROS intracelulares	
3.B.3. Evaluación del efecto de las fracciones de Ad en la oxidación lipídica	173
3.B.4. Evaluación del efecto de las fracciones de Ad sobre la defensa antioxidante celular	174
3.B.4.1. Actividad de SOD	174
3.B.4.2. Actividad GPx	174
3.B.4.3. Contenido de GSH intracelular	175
3.B.4.4. Efecto sobre el daño de membrana y mitocondrias celulares.	176
3.C. <b>EFFECTO DE LOS PÉPTIDOS SINTÉTICOS EN LA PREVENCIÓN DEL DAÑO OXIDATIVO INTRACELULAR.</b>	177
3.C.1. Citotoxicidad de los péptidos	177

3.C.2.	Evaluación del efecto de los péptidos en el contenido de ROS intracelulares	177
3.C.3.	Efecto de los péptidos en la oxidación lipídica	178
3.C.4.	Efecto de los péptidos sobre las defensas antioxidantes celulares	179
3.C.4.1	Actividad de SOD	179
3.C.4.2	Actividad de GPx	180
3.C.4.3	Contenido de GSH intracelular	180
3.C.4.4	Efecto protector de los péptidos sintéticos sobre el daño en la membrana y mitocondria celulares.	181
<b>DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES</b>		183
<b>CAPÍTULO 4</b>		192
<b>SIMULACIÓN DE LA ABSORCIÓN GASTROINTESTINAL DE PÉPTIDOS DE AMARANTO</b>		
<b>INTRODUCCIÓN</b>		193
Absorción de péptidos bioactivos		193
Modelos de estudio de la absorción intestinal		198
<b>OBJETIVOS</b>		202
<b>MATERIALES Y METODOS</b>		203
4.1.	Muestras proteicas	203
4.2.	Simulación de la absorción intestinal.	203
4.2.1.	Monocapas de células Caco2-TC7 en insertos	203
4.2.2.	Medición de la Resistencia Transepitelial (TEER)	204
4.2.3.	Determinación de la actividad transportadora	204
4.2.4.	Análisis por RP-HPLC analítica	205
<b>RESULTADOS Y DISCUSION</b>		206
4.3.	Evaluación de la integridad de las monocapas mediante la resistencia eléctrica transepitelial (TEER)	206
4.4.	Simulación de la absorción intestinal de Ad	206
4.5.	Simulación de la absorción intestinal de las fracciones de Ad	209
4.6.	Simulación de la absorción intestinal de péptidos sintéticos	213
<b>CONCLUSIONES</b>		222
<b>PARTE II. ESTUDIOS <i>in vivo</i></b>		224
<b>CAPÍTULO 5. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA INCORPORACIÓN DE AISLADO DE AMARANTO EN LA DIETA DE RATAS WISTAR.</b>		225
<b>INTRODUCCION</b>		226
Ratas Wistar como modelo animal		226
Inducción del estrés oxidativo en modelos animales		227
<b>OBJETIVOS</b>		231
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>		232
5.1.	Elaboración de dietas	232
5.2.	Modelo animal y tratamiento	233
5.3.	Obtención de muestras	235
5.3.1.	Anestesia	235
5.3.2.	Extracción de sangre, órganos y perfusión	235
5.4.	Evaluación de la actividad antioxidante	236
5.4.1.	Plasma	236
5.4.1.1	Capacidad reductora del hierro del plasma (FRAP)	236
5.4.1.2	Evaluación de la prevención de la oxidación de lípidos	237
5.4.1.3.	Efecto sobre la actividad de la superóxido dismutasa (SOD).	237
5.4.1.4	Efecto sobre la concentración de glutatión reducido (GSH).	237
5.4.2.	Hígado y colon	238

5.4.2.1.	Evaluación de la prevención de la oxidación de lípidos en hígado	238
5.4.2.2.	Determinación de especies reactivas del oxígeno (ROS) en colon	238
5.4.2.3.	Efecto sobre la actividad de enzimas antioxidantes y GSH en hígado y colon	239
	Actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD):	239
	Actividad de la enzima Glutación peroxidasa (GPx).	239
	Determinación del contenido de GSH	
5.5	Análisis estadístico.	240
	<b>RESULTADOS</b>	241
5.A.	Peso de los animales y consumo de alimento	241
5.B.	Evaluación del efecto de las dietas sobre parámetros del plasma	242
5.B.1	FRAP	242
5.B.2.	Oxidación de lípidos (TBA).	244
5.B.3.	Actividad de la SOD	245
5.B.4.	Contenido de GSH.	247
5.C.	Evaluación del efecto de las dietas sobre parámetros del hígado	248
5.C.1.	Oxidación de lípidos (TBARS)	248
5.C.2.	Actividad de SOD.	249
5.C.3	Determinación de la actividad de GPx	249
5.C.4.	Contenido de GSH	251
5.D.	Evaluación del efecto de las dietas sobre parámetros del colon	252
5.D.1	Especies reactivas al oxígeno (ROS)	252
5.D.2.	Actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD).	253
5.D.3.	Actividad de la enzima GPx.	253
5.D.4.	Contenido de GSH	254
	<b>DISCUSION Y CONCLUSIONES</b>	256
	<b>CONCLUSIONES GENERALES</b>	262
	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	266

# **INTRODUCCIÓN**

## Alimentos funcionales

A lo largo del último siglo, las definiciones relacionadas con alimentación y nutrición se han visto claramente modificadas. Ha ocurrido un proceso de evolución desde un concepto basado en la incorporación de una dieta balanceada consumida con el objetivo de prevenir deficiencias y respaldar las funciones corporales normales, a los conceptos actuales relacionados con una dieta que se consume de manera óptima para mejorar la salud y prevenir el riesgo de enfermedades crónicas. En la actualidad la ciencia apoya firmemente la idea de que los alimentos pueden aportar, más allá de los nutrientes básicos, componentes específicos con beneficios para la salud (Wichansawakun y Buttar, 2019).

Este proceso de evolución del concepto y función de los alimentos ha surgido a partir del desarrollo en paralelo de varios fenómenos como la expansión de campos científicos relacionados a los alimentos y la salud; la gran cantidad de datos epidemiológicos que han ayudado a aclarar la función del régimen alimentario en la prevención y el control de la morbilidad y la mortalidad prematura causadas por las llamadas enfermedades no transmisibles (ENT); la identificación de componentes alimentarios específicos, algunos capaces de aumentar la probabilidad de aparición de estas enfermedades y otros capaces de prevenirlas; y los cambios experimentados por los regímenes alimentarios y los modos de vida en respuesta a la industrialización, la urbanización, el desarrollo económico y la globalización de los mercados. Todos estos fenómenos tienen grandes repercusiones en la salud y el estado nutricional de las poblaciones, sobre todo en los países en desarrollo y en los países en transición (OMS, 2003).

El concepto de alimentos funcionales nació en Japón en los años 80' dado el marcado incremento de gastos en salud como consecuencia del aumento de la expectativa de vida de sus habitantes. En un principio, estos alimentos entraron al mercado bajo la consigna de aportar los nutrientes suficientes para las personas de mayor edad y mejorar así, su calidad de vida. A partir de esta situación, el resto de los consumidores, informados de la relación que existe entre una buena alimentación y la salud, se interesaron cada vez más por este tipo de productos lo que llevó a su desarrollo en los Estados Unidos, Canadá y Europa. Existen, actualmente, varias definiciones de lo que implica un alimento funcional:

- La definición japonesa de FOSHU (alimentos para uso de salud específico) describe a aquellos *"alimentos que a partir de algún procesamiento tienen ingredientes funcionales con un comprobado efecto benéfico específico en la salud del consumidor y se usan para mantener o regular condiciones de salud específicas"* (Valenzuela y col., 2014). Entre estas condiciones de salud específica podemos mencionar la salud gastrointestinal, la presión arterial y el colesterol en la sangre.

- El Instituto Internacional de Ciencias de la Vida de América del Norte (ILSI) ha definido los alimentos funcionales como *"alimentos que en virtud de componentes alimentarios fisiológicamente activos proporcionan beneficios para la salud más allá de la nutrición básica"*

(Bagchi, 2008).

- La Acción concertada de la Comisión Europea sobre la ciencia alimentaria funcional en Europa considera que *“un alimento es funcional si se demuestra satisfactoriamente que afecta de manera beneficiosa una o más funciones específicas en el cuerpo, más allá de los efectos nutricionales adecuados, de una manera que sea relevante para estado mejorado de salud y bienestar”* (Documento consenso, 1999).

Los alimentos funcionales, por lo tanto, no constituyen una entidad única, bien definida y correctamente caracterizada. Un alimento puede ser funcional mediante la aplicación de cualquier medio tecnológico o biotecnológico para aumentar la concentración, agregar, eliminar o modificar un componente en particular, así como para mejorar su biodisponibilidad, siempre que se haya demostrado que el componente tiene efectos funcionales (Roberfroid, 1999). Abarcan, además, diversos componentes, nutrientes y no nutrientes, que afectan a toda una gama de funciones corporales relacionadas con el estado de bienestar y salud, la reducción del riesgo de enfermedad, o ambas.

En Argentina, a la fecha no se cuenta con una definición consensuada sobre los alimentos funcionales. Sin embargo, organismos como la Comisión Nacional de Alimentos (CONAL) y el Instituto Nacional de Alimentos (INAL) han organizado varios equipos de trabajo destinados al área de los alimentos funcionales, con el propósito de proponer normativa relacionada con esta cuestión. Por otro lado, los alimentos funcionales no están contemplados en el Código Alimentario Argentino (CAA) y de hecho este prohíbe en forma expresa las indicaciones en los rótulos o anuncios que se refieran a propiedades medicinales, terapéuticas o aconsejar el consumo de algún alimento por razones de estímulo, bienestar o salud (artículo 235 del CAA). A pesar de esto, en los últimos años se ha incorporado al CAA la definición de alimentos probióticos y prebióticos (artículos 1389 y 1390) lo que implicó la elaboración de protocolos que establecen los requisitos y evaluaciones para la inclusión de probióticos y/o prebióticos en un alimento.

Por otro lado, mediante una disposición del Ministerio de Salud de la Nación de fines del 2011 (Disposición 7730, noviembre de 2011) ha sido implementada en nuestro país una "Guía para la Presentación y Evaluación Científica de Declaraciones de Propiedades Saludables en Alimentos", creándose además una Comisión Evaluadora para la autorización de dichas declaraciones ([http://www.anmat.gov.ar/webanmat/normativa/Disposicion\\_7730-2011.pdf](http://www.anmat.gov.ar/webanmat/normativa/Disposicion_7730-2011.pdf)).

Es interesante remarcar que para poder incorporar una declaración de propiedades saludables a un producto, este documento establece que se analizarán “los estudios científicos, en humanos y otros estudios (*“in vivo”*, *“in vitro”* y *“ex vivo”*) que avalen la declaración, incluyendo evidencia favorable y desfavorable actualizada respecto de la misma”, lo cual reafirma la necesidad de realizar estos estudios cuando se evalúa un ingrediente o alimento funcional.

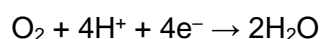
En definitiva, los alimentos funcionales pueden resultar un complemento interesante, dentro de una estrategia que promueva una buena salud, aunque debe remarcarse que no cumplen por sí

solos el objetivo de preservarla. Actualmente los alimentos funcionales tienen un lugar muy importante en el mercado, lo cual ha tenido un gran impacto en el procesamiento de alimentos y ha generado un gran incentivo para la industria alimentaria. De allí deriva la importancia de un marco regulatorio adecuado que pueda asegurar que los argumentos empleados para fundamentar el beneficio para la salud de un alimento sean veraces, sin ambigüedades y comprensibles para el común de la población.

### **Oxidación en sistemas biológicos.**

La oxidación es un proceso que tiene lugar tanto en los organismos vegetales como animales y se encuentra provocada, entre otras cosas, por la presencia de radicales libres. Un radical libre es cualquier especie química que contiene un electrón desapareado en el orbital de electrones más externo. Se producen cuando un enlace covalente se rompe y un electrón de cada par permanece con cada átomo. Un radical libre es una configuración no estable y por lo tanto altamente reactiva, debido a la tendencia de los electrones a aparearse (Santo y col., 2016). Los radicales libres varían ampliamente en su reactividad.

Por definición, la molécula de oxígeno (O<sub>2</sub>) califica como un radical libre debido a que contiene dos electrones desapareados, pero no es particularmente reactiva dado que posee una distribución electrónica especial (Halliwell y Gutteridge, 1990). Los radicales libres de mayor reactividad en los sistemas biológicos se derivan del oxígeno. Como se sabe, esta molécula es indispensable para la vida aeróbica. Las mitocondrias son la principal fuente de ATP en animales y forman *in vivo* una red compleja interconectada. Alrededor del 90% del que ingresa a través de los pulmones es utilizado por las mitocondrias para producir ATP mientras el porcentaje restante se usa en el metabolismo de varias enzimas oxidantes, que catalizan la oxidación de diversos compuestos químicos, es decir, la combinación de compuestos con oxígeno (Halliwell y Gutteridge, 2015). En el proceso de respiración celular el O<sub>2</sub> se reduce en las mitocondrias por captación de cuatro electrones y forma la molécula de agua H<sub>2</sub>O. El segmento de la cadena de transporte de electrones que utiliza O<sub>2</sub> para este proceso es la oxidasa terminal llamada citocromo oxidasa, la reacción general es:



La citocromo oxidasa es en realidad un conjunto de proteínas múltiple y complejo que cataliza esta reacción en varios pasos de reducción. Paralelamente a esta reacción, existen ciertas reacciones biológicas de oxidación en las cuales se transfiere un número menor de electrones al oxígeno, lo cual provoca una reducción parcial de esta molécula, generando productos altamente reactivos, conocidos como *Especies Reactivas del Oxígeno (ROS: Reactive Oxygen Species)*. La formación de ROS ocurre continuamente en las células como consecuencia de reacciones tanto enzimáticas como no enzimáticas. Las reacciones enzimáticas, que sirven como fuentes de radicales libres, incluyen aquellas involucradas en la cadena respiratoria en las mitocondrias (a



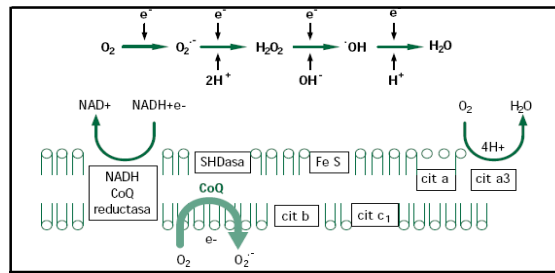
partir de la deficiencia del transporte de electrones durante la reducción del  $O_2$  a  $H_2O$ ), el sistema citocromo P450 en el retículo endoplásmico, las reacciones oxidativas en los peroxisomas y durante la fagocitosis, así como reacciones catalizadas por metales de transición. Si bien la generación de radicales libres endógena tiene la mayor atención, estas moléculas reactivas también tienen una fuente exógena ya que pueden ingresar al organismo a partir del humo del cigarrillo, la contaminación del aire y el agua, pesticidas y herbicidas, la exposición a la luz solar, el alcohol, los metales pesados, ciertos medicamentos quimioterapéuticos, disolventes industriales, cocción e irradiación con rayos gamma (Diplok y col., 1998).

Dentro de las ROS o moléculas pro-oxidantes derivadas del oxígeno, se encuentra un grupo de sustancias radicalarias tales como los radicales peroxilo, hidroxilo, el anión superóxido, el radical óxido nítrico y el oxígeno singulete; y un grupo de sustancias no radicalarias, aunque altamente reactivas, entre las que pueden mencionarse el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el ácido hipocloroso (HClO) y el anión peroxinitrito ( $ONOO^-$ ). También se utiliza el término *Especies reactivas del nitrógeno* (RNS = *Reactive Nitrogen Species*) para las especies derivadas del óxido nítrico. En la **Tabla I.1** se muestran los radicales libres con mayor implicación biológica.

*Tabla I.1. Clasificación y abreviatura de los radicales libres*

Clasificación	Radical libre	Abreviatura
Especies reactivas del oxígeno	Ión superóxido	$O_2^{\bullet -}$
	Radical hidroxilo	$OH^{\bullet}$
	Peróxido de hidrógeno	$H_2O_2$
	Radicales alcoxi y peroxi	$ROO^{\bullet}$ y $RO^{\bullet}$
Especies reactivas del nitrógeno	Óxido nítrico	$NO^{\bullet}$
	Dióxido nítrico	$NO_2^{\bullet}$
	Oxígeno singulete	$O_2^1$

La fuente endógena más importante de ROS es la cadena respiratoria mitocondrial. En el **Esquema I.1** se muestra la formación de especies reactivas a lo largo de la misma.

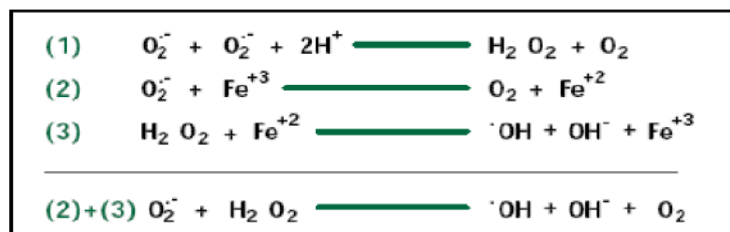


*Esquema I.1. Formación de especies reactivas de oxígeno a lo largo de la cadena respiratoria*

**Ión superóxido  $O_2^{\bullet-}$ :** Es el principal precursor de la mayoría de las ROS en los sistemas biológicos. Se forma cuando solo se agrega un electrón a la molécula de  $O_2$ . Se considera la ROS primaria y puede interactuar con otras moléculas para generar ROS secundarias. Se produce principalmente en las mitocondrias, causado por la fuga de electrones de la cadena respiratoria. También es un producto de reacciones de oxidación (Santo y col., 2016). Una de las reacciones más importantes del  $O_2^{\bullet-}$  es la reacción de dismutación donde actúa a la vez como reductor y oxidante. La dismutación depende de la acción catalítica de la superóxido dismutasa (SOD), produciendo  $H_2O_2$  y  $O_2$  en medio ácido.

**Peróxido de hidrógeno  $H_2O_2$ :** Es una importante ROS biológico, cuyo exceso puede causar daño a las células y tejidos. La eliminación de superóxido formado en la cadena de transporte de electrones forma esta molécula, la cual se produce continuamente en todos los tejidos. El superóxido se convierte en peróxido de hidrógeno por la acción de la enzima superóxido dismutasa y una vez producido difunde fácilmente a través de la membrana plasmática. El peróxido de hidrógeno también se produce por acción de la xantina oxidasa, la aminoácido oxidasa y la NADPH oxidasa y en los peroxisomas por consumo de oxígeno molecular en las reacciones metabólicas (Birben, y col., 2012).

Tanto el superóxido como el peróxido de hidrógeno son fundamentales ya que participan en la generación del radical hidroxilo a través de la reacción de Haber–Weiss. La formación del radical hidroxilo a partir del peróxido de hidrógeno puede ser catalizada por la presencia de iones de metales de transición de acuerdo con la reacción de Fenton (**Esquema I.2**) (Kanti Das y col., 2014).



*Esquema I.2.- Reacción de Fenton / Haber-Weiss*

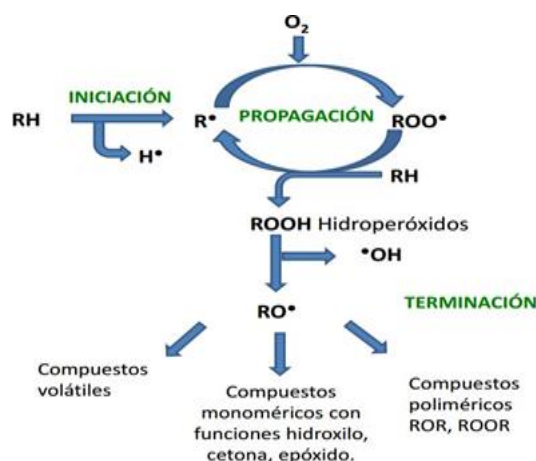
## Daño oxidativo a biomoléculas

- *Daño al ADN.* Las ROS pueden conducir a modificaciones en el ADN de varias formas, lo que

implica la degradación de bases, roturas de ADN de cadena simple o doble, modificaciones bases, mutaciones, deleciones o translocaciones y reticulación con proteínas. La mayoría de estas modificaciones del ADN son muy relevantes para la carcinogénesis, el envejecimiento y las enfermedades neurodegenerativas, cardiovasculares y autoinmunes (Birben y col., 2012). El radical más activo es el hidroxilo, el cual puede atacar tanto las purinas como las pirimidinas generando diversos productos de oxidación, siendo uno de los más importantes la 8-hidroxiguanina (8-OH-G). La formación de 8-OH-guanina en los sitios de unión de factores de transcripción puede modificar esta unión y, por lo tanto, cambiar la expresión de los genes relacionados.

- *Daño a proteínas.* Las proteínas pueden modificarse oxidativamente de tres maneras: modificación oxidativa de aminoácidos específicos, escisión de péptidos mediada por radicales libres y formación de enlaces cruzados de proteínas debido a la reacción con productos de peroxidación lipídica. Las proteínas que contienen aminoácidos como la metionina, la cisteína, la arginina y la histidina parecen ser las más vulnerables a la oxidación (Lobo y col., 2010). El daño oxidativo a las proteínas puede afectar la actividad de las enzimas, los receptores y el transporte de membrana. Los productos de proteínas con daños oxidativos pueden contener grupos muy reactivos que pueden contribuir al daño de la membrana y muchas funciones celulares. El  $O_2^{\cdot-}$  exhibe reactividad limitada con determinadas proteínas reaccionando tan solo con proteínas que contienen metales en su grupo prostético. Los especies  $OH^{\cdot}$ ,  $RO^{\cdot}$  y  $ONOO^{\cdot}$  son los que causan mayor daño, aunque las proteínas conteniendo grupos SH también pueden sufrir oxidación por medio de  $H_2O_2$ .

- *Daño a lípidos.* La oxidación de los lípidos de membrana provoca pérdida de la permeabilidad, la fluidez y la integridad de las mismas (la plasmática y de los orgánulos celulares) (Birben y col., 2012). Los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares y las lipoproteínas son particularmente susceptibles al ataque del radical  $OH^{\cdot}$ , del oxígeno singulete y del hidroperoxilo, iniciando un proceso de lipoperoxidación autocatalítico. Este proceso genera hidroperóxidos que pueden alterar la membrana, o transformarse en hidrocarburos volátiles, alcoholes o aldehídos (malondialdehído, entre otros), los cuales pueden difundir lejos del lugar donde se originaron, ocasionando daños a otras macromoléculas. Las reacciones de autooxidación de los lípidos pueden dividirse en tres etapas principales: iniciación, propagación y terminación (**Esquema I.4**).



*Esquema I.4. Oxidación de lípidos*

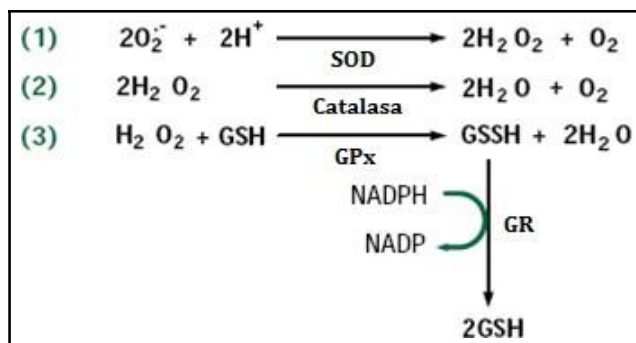
La oxidación directa de los lípidos insaturados por el oxígeno es termodinámicamente desfavorable, en función de ello, la producción de los primeros radicales debe ser catalizada. En presencia de factores de iniciación o iniciadores (I), los lípidos insaturados (RH) pierden un radical hidrógeno ( $H^\bullet$ ) de la posición  $\alpha$  con respecto a los dobles enlaces del ácido graso para formar un radical libre lipídico ( $R^\bullet$ ). Durante la fase de propagación el radical libre lipídico ( $R^\bullet$ ) reacciona muy rápidamente con el oxígeno molecular para formar radicales peroxilo ( $ROO^\bullet$ ). Esta reacción es mucho más rápida que la siguiente, en la cual se transfiere un hidrógeno de otra molécula lipídica RH para dar un hidroperóxido ROOH y otro radical  $R^\bullet$ . En la etapa de terminación de la oxidación, luego de alcanzar un máximo, la velocidad disminuye, los radicales peroxilo reaccionan unos con otros formando productos no radicalarios tales como cetonas, epóxidos, alcoholes, monómeros, dímeros y polímeros, conocidos como compuestos secundarios. Los hidroperóxidos pueden sufrir reacciones tales como la homólisis catalizada por metales o calor, generando radicales peroxilo y alcoxilo que pueden continuar la cadena amplificando el proceso de oxidación, o bien formar productos finales no radicalarios. Otras reacciones de terminación involucran la condensación de radicales peroxilo ( $ROO^\bullet$ ), alcoxilo ( $RO^\bullet$ ) o alquilo ( $R^\bullet$ ) (Tironi, 2005). Los hidroperóxidos generados por el mecanismo de radicales libres sufren una posterior descomposición mediante rutas de reacción complejas que conducen a la formación de una mezcla de sustancias monoméricas, poliméricas y volátiles de bajo peso molecular (productos secundarios) (Nawar, 1996). Cada hidroperóxido produce un conjunto de productos de degradación típicos y específicos, dependiendo de la posición del grupo peróxido en la molécula. Estos productos pueden a su vez sufrir posteriores oxidaciones y descomposiciones, contribuyendo a un gran “pool” de radicales libres (Frankel, 2005).

### **Defensa antioxidante en el organismo.**

El organismo humano posee varios mecanismos de defensa contra los radicales libres. Estos mecanismos se complementan mutuamente porque actúan sobre distintos oxidantes o en

diferentes compartimientos celulares. Entre ellos se destacan: a nivel fisiológico, el sistema microvascular cuya función es mantener los niveles tisulares de  $O_2$  siempre dentro de presiones parciales relativamente bajas y, a nivel bioquímico, la defensa antioxidante puede ser enzimática o no enzimática, así como sistemas reparadores de moléculas.

**Sistema enzimático:** Los organismos aerobios han desarrollado enzimas antioxidantes tales como: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx) entre otras, que son dependientes de la presencia de oligoelementos tales como selenio, cobre, manganeso, zinc, que actúan mediante las reacciones que se muestra en el **Esquema 1.5**.



**Esquema 1.5.- Mecanismos de acción de enzimas que actúan como “antioxidantes” en los organismos aerobios.**

La SOD, como ya se mencionó anteriormente, es la responsable de la reacción de dismutación del  $O_2^{\bullet -}$  a  $H_2O_2$ , que en reacciones posteriores catalizadas por la catalasa o por la GPx se detoxificará formando  $H_2O$  y  $O_2$ . La catalasa se encuentra principalmente en los peroxisomas, y su principal función es eliminar el  $H_2O_2$  generado en la beta-oxidación de los ácidos grasos, mientras que la GPx degradará el  $H_2O_2$  citoplasmático (Birben y col., 2012).

**Sistema no enzimático:** Las células utilizan una serie de compuestos de baja masa molecular que pueden actuar como "scavengers" (captadores de radicales libres) por diversos mecanismos, siendo uno de los más importantes la donación de un átomo de hidrógeno. Ejemplos de ellos son (Birben y col., 2012; Lobo y col., 2010):

-Carotenoides ( $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno, licopeno): Actúan en los compartimentos más hidrofóbicos en los que penetran con gran facilidad; Se ha encontrado que reaccionan con los radicales peroxilo, hidroxilo y superóxido.

-Ácido ascórbico (vitamina C): En las células, se mantiene en su forma reducida por reacción con glutatión. Es un agente reductor y puede neutralizar ROS como el peróxido de hidrógeno.

- $\alpha$ -tocoferol (vitamina E): Protege la integridad de las membranas celulares, además de poder neutralizar el oxígeno singulete ( $^1O_2$ ).

-Glutatión reducido (GSH): posee un grupo  $-SH$  que le permite atenuar el efecto de los radicales libres.

También pueden mencionarse: la cisteína, la ferritina, la ceruloplasmina -principal inhibidor sérico de la peroxidación lipídica-, el selenio, el manganeso y el zinc, la ubiquinona, el ácido úrico que neutraliza eficazmente radicales hidroxilo y peroxilo y puede prevenir la oxidación del ácido ascórbico, ciertos flavonoides y algunos compuestos polifenólicos (antocianinas, flavonoides, ácidos fenólicos) y proteicos, como más representativos e importantes (Anderson y col., 2000; Friedman, M., 1994; Williams y col., 1989; Zhang y Omaye, 2001).

*Sistemas reparadores:* se subdividen en dos grandes grupos, los directos y los indirectos:

- Sistema reparador directo: reducción de los grupos (S-S) de los aminoácidos azufrados de las proteínas por enzimas específicas como la disulfuro reductasa y la sulfóxido reductasa.
- Sistema reparador indirecto: primero se reconoce el daño molecular eliminándolo o degradándolo, y luego se sintetiza la parte eliminada. Esto ocurre tanto en las proteínas oxidadas y peróxidos lipídicos, como en las oxidaciones del ADN y ARN.

El tema de las defensas antioxidantes celulares será abordado con mayor detalle en el Capítulo 3.

### **Estrés oxidativo y sus consecuencias.**

El concepto de estrés oxidativo se introdujo para la investigación en biología desde hace muchos años y hace referencia al desequilibrio entre la generación o presencia de especies oxidantes (radicales libres y otras especies reactivas) y la capacidad de los sistemas de defensa antioxidante del organismo para hacer frente a la agresión oxidativa y sus efectos adversos (Mayne, 2003). Dicho desbalance puede deberse a un efecto de depleción de antioxidantes endógenos, a una incorporación dietaria insuficiente de antioxidantes y/o a una producción aumentada de especies reactivas como consecuencia de ciertas circunstancias anormales como inflamación, isquemia, la presencia de iones catalíticos, etc. El estrés oxidativo se ha relacionado con una gran variedad de enfermedades (cardiovasculares, neurológicas, cáncer, etc), y muchos de los procesos así como los cambios generados a nivel celular se pueden utilizar como biomarcadores de estrés oxidativo y de las enfermedades en cuestión (Jing, 2019). Cuando se produce estrés oxidativo, las células intentan contrarrestar los efectos oxidantes y restablecer el equilibrio redox mediante la activación o el silenciamiento de genes que codifican enzimas defensivas, factores de transcripción y proteínas estructurales. Una mayor producción de ROS en el organismo puede generar los daños antes descritos en la estructura del ADN, provocar la modificación de proteínas y lípidos, y también la activación de varios factores de transcripción inducidos por el estrés y la producción de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias (Birben y col., 2012). Estos aspectos serán tratados con mayor detalle en el Capítulo 3.

Entre los procesos más importantes asociados al estrés oxidativo se encuentran los procesos de envejecimiento celular. Aún en condiciones no patológicas el daño oxidativo es parcialmente responsable del envejecimiento natural de las células. También se asocia a muchas enfermedades crónicas (Wei y Lee, 2002), como las enfermedades cardiovasculares relacionadas

principalmente con la oxidación de las LDL, el cáncer (Collins y col., 2005), las cataratas, disfunciones del sistema inmunitario, y las enfermedades degenerativas del sistema nervioso, tales como las enfermedades de Parkinson y de Alzheimer (Halliwell, 2001, Liu y col., 2001).

Estudios epidemiológicos han demostrado una correlación inversa entre el desarrollo de estas enfermedades crónico-degenerativas y el consumo de dietas ricas en frutas y vegetales. Los efectos protectores de estos alimentos están asociados a la presencia de sustancias antioxidantes. Por ello la ingestión de antioxidantes a través de la dieta tiene una importante función en la prevención de estas enfermedades (Berg y col., 1999).

### **Antioxidantes dietarios**

Los antioxidantes sintéticos y naturales se utilizan habitualmente en alimentos y en medicamentos, especialmente en aquellos que contienen aceites y grasas para proteger los alimentos contra la oxidación. Hay una serie de antioxidantes fenólicos sintéticos, por ejemplo, el butilhidroxitolueno (BHT) y el butilhidroxianisol (BHA). Estos compuestos han sido ampliamente utilizados como antioxidantes en la industria alimentaria, cosmética e industria terapéutica. Sin embargo, algunas propiedades físicas de BHT y BHA, como su alta volatilidad e inestabilidad a temperaturas elevadas, la legislación estricta sobre el uso de aditivos alimentarios sintéticos, la naturaleza carcinogénica de algunos antioxidantes sintéticos y las preferencias de los consumidores han llevado a un aumento en el interés por los antioxidantes naturales (Lobo y col., 2010).

Desde el punto de vista de los sistemas biológicos, antiguamente la definición de antioxidantes se refería a cualquier sustancia que, cuando está presente en bajas concentraciones en comparación con las de un sustrato oxidable, retrasa o previene la oxidación de ese sustrato (Halliwell, 1990). Si bien esta definición hace referencia a todos los sustratos oxidables que están presentes en las células (lípidos, proteínas, ADN y carbohidratos) no se relaciona con los mecanismos antioxidantes intracelulares por lo cual se han establecido nuevas definiciones, lo cuál será abordado en el Capítulo 3 de esta Tesis.

#### *Mecanismo general de acción de los antioxidantes.*

Por lo general, las reacciones de oxidación incluyen etapas de iniciación, propagación y terminación. Todo el proceso ocurre a través de reacciones en cadena que se van desarrollando a través de la formación de radicales libres. Los antioxidantes, por lo tanto, se suelen clasificar en dos grandes grupos: aquellos que inhiben o retardan la formación de radicales libres a partir de su precursor inestable, es decir, que inhiben el proceso de iniciación, denominados antioxidantes “preventivos” o antioxidantes secundarios; y aquellos que interrumpen la reacción radicalaria en cadena, es decir, la propagación, y se suelen denominar antioxidantes “chain-breaking”, “interruptores de la cadena de reacciones” o antioxidantes primarios. Estos últimos son los



antioxidantes más estudiados y su mecanismo de acción suele ser la transferencia de un átomo de hidrógeno (HAT = hydrogen-atom transfer), donde la fuerza impulsora de esta transferencia es la formación de radicales deslocalizados “estables” que hacen que se interrumpan las reacciones en cadena de los radicales o que continúen con baja eficiencia. Específicamente, un antioxidante de este tipo (HAT) lo que hace es donar su átomo de hidrógeno débil a un radical  $\text{ROO}\cdot$ , de una manera mucho más rápida de lo que el radical  $\text{ROO}\cdot$  puede reaccionar con un sustrato. El radical  $\text{A}\cdot$ , que se forma como producto de la reacción entre el antioxidante  $\text{AH}$  y  $\text{ROO}\cdot$ , es estable y no es capaz de continuar con la autooxidación de la cadena, entonces la reacción se detiene. Este mecanismo HAT ha sido extensamente estudiado y ha sido ampliamente aceptado como el mecanismo predominante de protección frente a la oxidación iniciada por ROS (Wright y col., 1997, Vinqvist y Barclay, 2000). Por otra parte, en las reacciones de transferencia de electrones (SET = single electron transfer) el antioxidante transfiere un electrón para reducir un compuesto, que podría ser un carbonilo, un radical o un metal. Las reacciones HAT vienen determinadas por la entalpía de disociación, de manera que en aquellos compuestos donde este parámetro presente un bajo valor, será más fácil la abstracción de un átomo de hidrógeno. Asimismo, se ha observado que ciertos aspectos estructurales, como la presencia de un grupo hidroxilo en posición orto o la posible formación de enlaces intermoleculares entre distintos sustituyentes, pueden contribuir a reducir la entalpía de disociación, facilitando la formación de un radical estable. Por el contrario, en aquellas reacciones en las que está en juego la transferencia de electrones, será determinante el valor del potencial de ionización (Siquet y col., 2006).

La capacidad antioxidante se utiliza para evaluar la eficacia de los antioxidantes. En la literatura, se encuentra una diversidad de metodologías basadas en HAT: el ensayo de Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno (ORAC), el ensayo del parámetro antioxidante de atrapamiento de radicales totales (TRAP), el ensayo de peroxidación de lípidos (LPA), entre otros. Para las reacciones redox basadas en transferencia de electrones se usan comúnmente varios ensayos de antioxidantes, como la Capacidad Antioxidante Equivalente de Trolox (TEAC); la actividad de captación de radicales 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) y el ensayo de capacidad de reducción de cobre II (CRC). Además, la quelación transitoria de iones metálicos es otro efecto de los antioxidantes naturales. El mecanismo químico involucrado es la inhibición de la reacción de Fenton, que es responsable de la formación de radicales con hidroxilo y posteriormente conduce a reacciones de cadena radical (Zou y col., 2016).

### **Péptidos bioactivos y antioxidantes de naturaleza proteica.**

Las proteínas de la dieta aportan los aminoácidos necesarios para el desarrollo y mantenimiento de las células y los tejidos de nuestro organismo. Las mismas pueden además contener secuencias de aminoácidos de pequeño tamaño que se encuentran encriptadas y que al liberarse constituyen *péptidos bioactivos*. Dichos péptidos pueden ser liberados por hidrólisis, ya sea por

hidrólisis enzimática *in vitro* durante el procesamiento de los alimentos; como producto de la actividad de ciertos microorganismos, por ejemplo, durante las fermentaciones; o como resultado de la hidrólisis gastrointestinal que sufren al ser digeridos por el organismo de los individuos.

La biodisponibilidad es un aspecto fundamental del estudio de compuestos potencialmente activos. El término biodisponibilidad puede definirse como la fracción del componente ingerido disponible en el sitio de acción para su utilización en funciones fisiológicas normales, y se determina mediante ensayos *in vivo*. La biodisponibilidad es el resultado de tres pasos principales: digestibilidad y solubilidad del elemento en el tracto gastrointestinal; absorción del elemento por las células intestinales y transporte a la circulación; y la incorporación desde la circulación a la entidad funcional o al objetivo. La biodisponibilidad además incluye dos términos adicionales: bioaccesibilidad y bioactividad. La bioaccesibilidad se ha definido como la fracción de un compuesto que se libera de su matriz alimentaria dentro del tracto gastrointestinal y, por lo tanto, queda disponible para la absorción intestinal (generalmente establecida a partir de procedimientos *in vitro*). Incluye la secuencia de eventos que tienen lugar durante la digestión de los alimentos para la transformación en material potencialmente bioaccesible, pero excluye la absorción/asimilación a través del tejido epitelial y el metabolismo pre-sistémico (tanto intestinal como hepático) (Verhoeckx y col., 2015).

Cada vez es mayor el interés por los péptidos que, además de su valor nutricional, presentan cierta actividad biológica, regulando procesos fisiológicos. Existen evidencias que demuestran que algunos péptidos son capaces de atravesar el epitelio intestinal y afectar los principales sistemas: cardiovascular, nervioso, gastrointestinal e inmune. Se han podido aislar, identificar y secuenciar péptidos con actividad antimicrobiana, antitrombótica, antihipertensiva, hipocolesterolémica, antioxidante, inmuno y citoreguladora, entre otros.

Proteínas e hidrolizados proteicos de diversas fuentes han mostrado tener actividad antioxidante (Toldrá y col., 2018). Por ejemplo, hidrolizados de albúmina de huevo y yema de huevo (Yousr y col., 2016), caseína, suero lácteo (Awad y col., 2016), elastina, gelatina de pescado (Kim y col., 2001), gluten de trigo (Zhu y col., 2006), quinoa (Martínez y col., 2018), soja (Sanjukta y Rai, 2016), sésamo (Lu y col., 2019) y proteínas miofibrilares han demostrado inhibir la oxidación de lípidos y ácidos grasos insaturados en diferentes sistemas modelos (Wang y Xiong, 2005). La carnosina es un dipéptido que surge de la hidrólisis natural de productos cárnicos que actúa como secuestrador de radicales libres y como inhibidor de la iniciación de la oxidación lipídica originada por especies reactivas del oxígeno (Bodyrev y Johnson, 2002), por inactivación de especies oxígeno singulete por la histidina presente (Mendis y col., 2005 y Wang y col., 2006); también se han demostrado propiedades antioxidantes en hidrolizados proteicos de canola (Cumby y col., 2008) y en hidrolizados de proteínas animales (Kim y col., 2001), entre otros.

Los péptidos pueden ser generados en el tracto digestivo, debido a la hidrólisis de las proteínas de la dieta por las enzimas gastrointestinales, con la posibilidad de que expresen su actividad

biológica en el organismo. Algunos de ellos han demostrado poseer un efecto beneficioso *in vivo* luego de ser administrados por vía oral (Sun y col., 2009), lo cual sugiere que algunos oligopéptidos fisiológicamente activos podrían ser absorbidos a través del epitelio intestinal, reteniendo su estructura y actividad intactas.

Si bien tradicionalmente sólo se consideraban a las proteínas de la dieta como una fuente de energía y de aminoácidos esenciales, en la actualidad ha surgido un creciente interés por la identificación y caracterización de diversos péptidos bioactivos de fuentes de origen animal y vegetal. Poder determinar cuál es la composición de los péptidos en estudio, resulta un desafío sumamente importante, dado que en los últimos años se ha demostrado que existe una estrecha relación entre la estructura y la actividad de los mismos (Chen y col., 1998; Philanto-Leppala, 2000). La literatura muestra numerosas publicaciones en las que se realizan estudios sobre péptidos de origen alimentario con actividad antioxidante, a través de las cuales se han podido establecer diversas conclusiones respecto a dicha relación (Sarmadi e Ismail, 2010).

Se ha demostrado que la presencia de ciertos aminoácidos en los péptidos, tales como la histidina, cisteína, prolina, metionina, lisina y los aminoácidos aromáticos, estaría relacionada con la actividad antioxidante de los mismos a través de diferentes mecanismos (Wang y De Mejia, 2005). En muchos casos se ha observado que la presencia de aminoácidos hidrofóbicos (prolina y leucina) en el extremo N-terminal potenciaría la actividad antioxidante de los péptidos. Chen y col. (1998) postularon que la presencia de aminoácidos hidrofóbicos podría mejorar la accesibilidad de péptidos antioxidantes en ciertos sitios celulares como las cadenas poliinsaturadas de ácidos grasos de las membranas biológicas. Saito y col. (2003) por su parte, han realizado series de combinatorias de tripéptidos, demostrando que cualquier cambio en la secuencia de aminoácidos influiría directamente sobre la actividad antioxidante de los mismos. La unión de los aminoácidos para dar como resultado un péptido puede tener un efecto sinérgico como antagónico en términos de la actividad antioxidante resultante (Hernández-Ledesma y col., 2005). También se ha postulado y evidenciado que los aminoácidos aromáticos (tirosina, fenilalanina y triptófano) podrían actuar donando protones a los radicales libres o favoreciendo la quelación de metales que, en muchos casos, actúan como prooxidantes. Además, los grupos sulfhidrilo de la cisteína también podrían actuar secuestrando radicales libres. Según Wang y Xiong (2005), los residuos de cisteína y triptófano presentes en la proteína de papa y liberados luego de la hidrólisis, podrían actuar como antioxidantes. A partir de estudios con péptidos sintéticos diseñados se ha demostrado que la histidina y prolina juegan un rol importante en la actividad antioxidante de péptidos (Peña Ramos y col., 2004). Especialmente la histidina presenta una fuerte actividad secuestrante de radicales libres, debido a su habilidad de donar protones del grupo imidazol (Mendis y col., 2005, Wang y col., 2006). Chen y col. (1998) diseñaron péptidos sintéticos conteniendo histidina para examinar la relación entre este residuo y la actividad antioxidante. Estos autores concluyeron que la presencia de histidina en el péptido es decisiva para la actividad

antioxidante. De acuerdo con Cumby y col. (2008), la presencia de aminoácidos aromáticos afecta la capacidad antioxidante de un péptido, en particular en la tirosina el grupo hidroxilo es capaz de donar hidrógeno y estabilizar radicales libres. Además se puede esperar que un péptido con mayor cantidad de aminoácidos hidrofóbicos presente una mayor potencia antioxidante debido a la mayor interacción con los ácidos grasos (Mendis y col., 2005).

En diversos trabajos se han obtenido y aislado péptidos bioactivos a partir de diferentes fuentes proteicas, y se ha determinado la secuencia de aminoácidos responsables de la actividad antioxidante; de los resultados de dichas investigaciones se puede destacar que tanto la composición de aminoácidos como la secuencia de los péptidos son críticas para su actividad antioxidante. Según Chen y col. (1998), los péptidos antioxidantes pueden actuar como quelantes de iones metálicos, inhibidores de oxígeno singulete o secuestradores de radicales hidroxilos, siendo su secuencia primaria muy importante para que los mismos presenten esta actividad.

Si bien existen muchos estudios, resulta imposible deducir y confirmar cuál será el comportamiento de péptidos conformados por 4 aminoácidos o más, debido a la gran cantidad de información necesaria y lo costoso que resulta realizar diversos ensayos para la identificación y evaluación de la actividad para cada péptido. Es por eso que se han desarrollado modelos teóricos que surgen como una herramienta muy útil para el análisis de las relaciones estructura/actividad de los péptidos. Uno de los modelos matemáticos más utilizado es el modelo cuantitativo QSAR (quantitative structure- activity relationship) (Li y Li, 2013). Dicho modelo proporciona relaciones matemáticas que permiten expresar la relación entre la estructura y la actividad de los péptidos a partir de datos encontrados en estudios previos en la literatura, y puede ser utilizado para estimar o predecir la actividad biológica de un determinado compuesto en relación con su estructura química. Este modelo asume principalmente que la actividad biológica está relacionada con propiedades estructurales como son los atributos electrónicos, la hidrofobicidad y la estericidad (Hansch y Leo, 1995; King y col., 1993).

## **Amaranto**

El grano de amaranto, al igual que el maíz y los porotos, supo ser un grano de alta popularidad e importancia entre las antiguas civilizaciones Maya, Azteca e Inca. Fue utilizado por estos pueblos desde antes de la llegada de los españoles, ocupando un lugar primordial debido, principalmente, a su papel en las festividades pagano- religiosas en las que se utilizaba para elaborar figuras que representaban a distintos dioses (Velasco y Heyden, 1986). Estas ceremonias religiosas fueron abolidas por los conquistadores españoles lo cual colaboró con la caída en la producción y utilización de este vegetal a pesar de sus bondades nutricionales (Kalakow y Hauptli, 1994; Bressani, 1994). En Argentina el cultivo se practicaba originalmente en Jujuy (Purmamarca, Humahuaca), Salta (Pampa Grande), Tucumán y Catamarca, en pequeñas parcelas cerca de viviendas de agricultores. En la actualidad la siembra se ha extendido a las provincias de La

Pampa, Córdoba Santa Fe y San Luis, siendo su producción relativamente baja (Castels, 2006). La familia Amaranthaceae comprende más de 60 géneros y 800 especies, además de las especies que producen granos existen otras que ofrecen sus hojas como verdura de alto valor nutritivo, tanto por su contenido proteico como de vitaminas y minerales (Kalakow y Hauptli, 1994). Se trata de un pseudocereal cuyo tamaño de semilla es, entre los granos comestibles, uno de los más pequeños, lo cual limita su producción a pesar de sus aceptables características.

En cuanto al contenido proteico del grano de amaranto, podemos decir que se encuentra entre 13 y 18 % dependiendo de la especie y que es de alta calidad por su adecuado balance y elevado contenido de aminoácidos esenciales, en particular de lisina (Betscharet y col., 1981; Bressani, 1989), aunque también posee un importante contenido de triptofano, metionina y cisteína. La leucina es el principal aminoácido limitante, mientras que valina, isoleucina y treonina se encuentran en valores cercanos a los requeridos en la dieta humana (FAO/WHO, 1973). Según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) sobre un valor proteico ideal de 100 el grano de amaranto presenta 75; la soja 68, el trigo 60 y el maíz 44. La proteína de amaranto es un buen complemento de estos y otros cereales, así como de la leche, soja, frijol y avena (Bressani, 1989; Bressani, 1994). Por otro lado, la calidad de las proteínas no depende sólo de la composición de aminoácido sino también de la biodisponibilidad. La digestibilidad proteica, la disponibilidad de lisina y la utilización proteica neta de las proteínas de amaranto son definitivamente superiores a las de los cereales y similares a las de la caseína (Salcedo-Chávez y col., 2002).

El porcentaje de lípidos varía entre 5 y 10 % lo cual se considera relativamente alto; posee un atractivo balance de ácidos grasos saturados, insaturados y poliinsaturados predominando los insaturados, principalmente el oleico, que representa entre 20 y 29 %, y linoleico, entre 45 y 58 % dependiendo de la especie (Prakash y col., 1995; Ayoride y col., 1989; Bressani y col., 1987). Existen algunas especies, con niveles relativamente elevados de escualeno lo que permite considerarlas una fuente vegetal rica en este compuesto (Becker, 1994; Khaw y Chieng, 1997); las semillas de estas especies, servirían como una fuente alternativa para la obtención de este lípido, disminuyendo la dependencia con los animales marinos (Han-Ping y Corke, 2003; Marcone, 2000).

El contenido de hidratos de carbono varía entre 62 y 70 %, siendo el almidón, representado principalmente por amilopectina, el componente más abundante ya que su contenido es entre 48 y 69%. El diámetro del gránulo de almidón oscila entre 1 y 3 micrones, mientras que los de maíz son hasta 10 veces más grandes y los de la papa hasta 100 veces mayores. Estas reducidas dimensiones del gránulo facilitan su digestión, que resulta de 2,4 a 5 veces más rápida que el almidón de maíz (Jiménez y col., 2009).

Además del elevado nivel de proteína y de la presencia de aminoácidos esenciales, las concentraciones de calcio, hierro y fósforo superan a varios de los cereales tradicionales.

El redescubrimiento del amaranto como cultivo significativo potencial está respaldado por varias características de importancia: su fácil adaptación desde el punto de vista agrícola, la tolerancia que demuestra a las sequías y a las altas temperaturas y el hecho de que posee una composición química y valor nutritivo muy atractivos. Se ha encontrado que la digestión y la absorción son altas en estudios de alimentación en los que se utilizaron productos molidos y tostados de amaranto (Morales y col., 1988). El equilibrio de hidratos de carbono, grasas y proteínas del amaranto dan la oportunidad de lograr una absorción de nutrientes equilibrado con menores cantidades de consumo que con otros cereales. El amaranto ha sido utilizado con éxito en combinación con otros granos para producir cereales para el desayuno, tortitas, panes y galletas.

#### *Proteínas de la semilla de amaranto.*

En base a propiedades de solubilidad en una extracción secuencial, Osborne (1924) clasificó las proteínas de las plantas en cuatro grupos: 1) albúminas, solubles en agua; 2) globulinas, solubles en soluciones salinas diluidas; 3) prolaminas, solubles en alcohol y 4) glutelinas, solubles en ácidos o álcalis diluidos. Las proteínas de amaranto se han clasificado de acuerdo al método de Osborne, presentando ciertos inconvenientes debido a que cada grupo de investigación ha utilizado un método de aislamiento diferente, con lo que se dificulta una clasificación uniforme. Una de las fracciones más abundante es la de las albúminas, aunque el rango informado por distintos autores es muy amplio (10 a 65 %); seguida en orden de abundancia por las glutelinas (7,5 a 56 %) y las globulinas (13 a 56 %). Las prolaminas son las proteínas que se encuentran en menor proporción en este pseudocereal, en concentraciones que oscilan entre un 1,5 y un 11 % (Castellani, 2000). Los porcentajes y, por lo tanto, el orden de las distintas fracciones varían de acuerdo a la metodología aplicada para la extracción. En aquellos casos en que se observa un alto porcentaje de albúminas, el de glutelinas es menor y viceversa. Konishi y col. (1991) han asignado esta variabilidad a una fracción proteica muy singular con características de solubilidad única, que han denominado albúmina-2 y que según las diferentes formas de extracción se encontraría en una u otra fracción dado que se extrae empleando agua luego de haber extraído las albúminas tradicionales (albúmina-1) y las globulinas. Estos autores han determinado que tomando las fracciones albúmina-1, albúmina-2 y globulina la abundancia relativa de cada una es 40%, 30% y 30% respectivamente, datos similares a los encontrados en nuestro laboratorio (Martinez, 1997). Chen y Paredes-López (1997) determinaron, en extractos de *Amaranthus hypochondriacus*, la presencia de esta fracción y por sus características estructurales la denominaron globulina, mientras que en nuestro laboratorio y teniendo también en cuenta sus características estructurales se la denominó globulina-P (Gp) (Castellani, 2000). Cuando se preparan aislados proteicos de amaranto, aparecen también discrepancias respecto a cuál es la fracción proteica principal; se sabe que en realidad la proporción de las diferentes fracciones en estos aislados y sus propiedades funcionales y nutricionales particulares dependen del método de

preparación utilizado (Martínez y Añón, 1996).

Si bien la semilla presenta tres grupos de proteínas -las estructurales, las biológicamente activas y las de reserva o almacenamiento - estas últimas constituyen más del 80 % y son, por lo tanto, las que más influyen en la calidad nutricional proteica de la semilla. Las proteínas de almacenamiento son aquellas cuya velocidad de síntesis se incrementa durante el desarrollo de la semilla y que se acumulan en vesículas rodeadas de membrana denominadas cuerpos proteicos. Posteriormente, durante la germinación, estas proteínas son degradadas para proveer principalmente nitrógeno reducido y carbono con el fin de sostener el crecimiento del brote y el desarrollo inmediato luego de la germinación (Castellani, 2000). Posteriormente a Osborne, han surgido otras clasificaciones de las proteínas vegetales basadas en la estructura de los genes, la homología de las secuencias de aminoácidos y su mecanismo de acumulación en los cuerpos proteicos (Fukushima, 1991). Esta clasificación divide a las proteínas de reserva en dos tipos, las globulinas y las prolaminas. Las primeras se caracterizan por acumularse en cuerpos proteicos o vacuolas derivadas del aparato de Golgi, sus genes contienen varios intrones y la estructura primaria de la proteína no presenta secuencias repetitivas. Por otro lado las prolaminas se acumulan dentro de cuerpos proteicos derivados del retículo endoplásmico, sus genes a pesar de ser eucariotas llamativamente no presentan intrones y presentan secuencias de aminoácidos repetitivas en determinadas zonas de la molécula.

A continuación se resumen las principales características de las fracciones proteicas del amaranto (según Osborne):

*Albúminas:* se extraen a partir de la harina con agua. De acuerdo a los resultados obtenidos por Konishi y col. (1991), esta fracción se encontraría ubicada en el citoplasma de la célula, ya que es rápidamente degradada al someter a la harina a un tratamiento enzimático. La solubilidad de esta fracción proteica no se ve mayormente afectada por la presencia de diferentes cationes metálicos, se informaron valores por encima del 70 % de proteína soluble. Todos los autores coinciden en destacar como componentes principales de esta fracción polipéptidos con una masa molecular entre 10 y 40 kDa (Gorinstein y col., 1991; Segura Nieto y col., 1992). Además han sido caracterizados polipéptidos con masas moleculares mayores, hasta 94 kDa, aunque éstos se encuentran en menor proporción (Konishi y col., 1991; Barba de la Rosa y col., 1992; Segura Nieto y col., 1994; Martínez y Añón, 1996). Todas las descripciones sobre esta fracción proteica, coinciden en señalar que sus polipéptidos no se encuentran unidos por enlaces disulfuro. La estabilidad térmica encontrada para esta fracción proteica es baja, siendo su temperatura de desnaturalización aproximadamente 60 °C, (Martínez y Añón, 1996; Gorinstein y col., 2001). La composición de aminoácidos de las albúminas presentó cierta variabilidad en los valores asignados a lisina (6,2 - 9,4 %p/p) y aminoácidos azufrados (4,1 - 9,7 %p/p) según distintos autores (Mora-Escobedo y col., 1990; Bressani y García Vela, 1990; Gorinstein y col., 1991; Konishi y col., 1991; Segura Nieto y col., 1992; Barba de la Rosa y col., 1992). En general, los

componentes mayoritarios asignados a esta fracción son los aminoácidos azufrados, glutamina/ácido glutámico, y asparagina; mientras que los que se encuentran en menor proporción son leucina y treonina. Dentro de la fracción albúminas, se han caracterizado algunas proteínas con diferente actividad biológica. Entre estas últimas, se encuentra un inhibidor de tripsina y uno de  $\alpha$ -amilasa que han sido caracterizados y secuenciados por Valdés Rodríguez y col. (1993) y Lu y col. (1999) respectivamente. El inhibidor de tripsina, es un polipéptido de 7,4 kDa, con un  $pI = 7,5$ , con elevados contenidos de valina, arginina y ácido glutámico y no contiene metionina. En cuanto al inhibidor de  $\alpha$ -amilasa (AAI), es una polipéptido de sólo 32 aminoácidos que consta de tres hojas  $\beta$  antiparalelas unidas por enlaces disulfuro siguiendo un esquema característico para estos inhibidores.

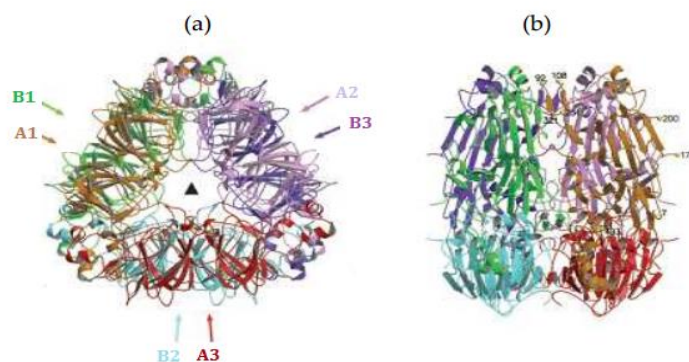
*Globulinas*: se extraen con soluciones salinas de fuerza iónica entre 0,5 M y 1,0 M y pH próximo a siete a partir del residuo que queda luego de la extracción de albúminas con agua. Para el amaranto se reconocen, al igual que en las leguminosas, dos tipos con diferente coeficiente de sedimentación, leguminas y vicilinas, la mayor parte de las globulinas de amaranto corresponden a las denominadas 11S y una fracción minoritaria a las 7S.

*Globulina 7S*: aunque existen algunos estudios previos que hacen referencia a esta fracción proteica (Segura Nieto y col., 1992; Barba de la Rosa y col., 1992; Martínez y col., 1997), fue Marcone (1999) quien la purificó y estudió con más detalle. Esta globulina es un hetero-oligómero cuya masa molecular, determinada por cromatografía de exclusión molecular, es cercana a los 200 kDa. Su punto isoeléctrico está comprendido entre 5,2 y 5,8. El perfil electroforético de esta fracción determinó la existencia de un gran número de polipéptidos de masas moleculares comprendidas entre 90 y 15 kDa, que carecen de uniones disulfuro. Sólo unas pocas bandas son compartidas con la globulina 11S. Las masas determinadas para los polipéptidos de globulina 7S son: 90; 71; 40; 37; 35; 31; 24 y 15 kDa (Barba de la Rosa y col. 1992; Martínez y col., 1997). El análisis de la estructura secundaria reveló la presencia de una baja proporción de estructura de  $\alpha$ -hélice (aproximadamente 12%), siendo más importante la estructura de hoja- $\beta$  (aproximadamente 50 %) (Marcone, 1999). De los estudios de estructura terciaria se puede inferir la presencia de aminoácidos aromáticos próximos a la superficie que tendrían una alta movilidad.

*Globulina 11S*: dentro de la fracción globulinas, la globulina 11S es la que se encuentra en mayor proporción. En uno de los primeros ensayos enfocados a la caracterización de esta fracción se informó la presencia de un 81 % de globulina 11S en el extracto crudo de globulinas (Konishi y col., 1985). En coincidencia con este resultado, Marcone y Yada (1991 y 1998) encontraron un porcentaje similar al analizar siete líneas de amaranto genéticamente diferentes. En estado nativo, la globulina 11S forma un hetero-oligómero. La determinación de su masa por cromatografía de exclusión molecular, ha arrojado valores muy diferentes que van desde 440 hasta 166 kDa (Konishi y col., 1985, Barba de la Rosa y col., 1992). Otros grupos de investigación encontraron valores de aproximadamente 300 kDa (Segura Nieto y col., 1994; Martínez y col., 1997). Según



informaran Marcone y Yada (1998), existe cierta diversidad en la masa molecular de la globulina 11S extraída de amarantos pertenecientes a diferentes líneas genéticas, estos autores encontraron masas moleculares comprendidas entre 237 y 381 kDa. Estos oligómeros están constituidos por subunidades polipeptídicas de diferentes tamaños, con valores variables informados por distintos laboratorios: grupo I (38 – 75,5 kDa), grupo II (31 – 37,5 kDa) y grupo III (14 – 23 kDa). En condiciones no reductoras se determinó una mayor presencia de los polipéptidos del grupo I, mientras que estos están prácticamente ausentes en presencia de 2-mercaptoetanol indicando que los mismos están formados por polipéptidos más pequeños de los otros grupos unidos por puentes disulfuro (Castellani, 2000). Macone y Yada (1991) detectaron un polipéptido de 67 kDa principalmente asociado a moléculas polimerizadas, y determinaron que el polipéptido de 75,5 kDa presente en condiciones no reductoras está constituido por dos subunidades de 37,5 kDa. En isoelectroenfoque los polipéptidos de los grupos II y III se comportan igual que los polipéptidos ácidos y básicos de soja, respectivamente (Segura-Nieto y col., 1994). De un modo semejante a lo que ocurre en otras globulinas tipo 11S, se han detectado en amaranto, una pequeña proporción de agregados de masa molecular mayor a la informada para las moléculas de globulina 11S en estado nativo. Estos agregados están estabilizados por uniones disulfuro (Marcone y Yada, 1991 y 1998; Martínez y col., 1997). La composición de aminoácidos del extracto crudo de globulinas que comprende tanto a 7S como a 11S, fue determinada por varios autores (Konishi y col., 1985; Gorinstein y col., 1991; Barba de la Rosa y col., 1992), todos ellos coinciden en destacar a glutamina/ácido glutámico y asparagina/ácido aspártico como los aminoácidos principales encontrados en esta fracción. La presencia de valores altos para estos aminoácidos parece ser una característica común en proteínas de reserva de semillas (Marcone y Yada, 1991). En términos de aminoácidos esenciales, las globulinas de amaranto poseen una proporción de aminoácidos azufrados y de lisina superior a la de las globulinas de avena y soja (Segura Nieto y col., 1994). Marcone y Yada (1998), determinaron que la estructura secundaria de la globulina 11S contenía un porcentaje de hoja  $\beta$ -plegada que variaba entre 35 y 71 %, con aproximadamente un 7 % de  $\alpha$ -hélice y 18 % de giros  $\beta$ .



*Esquema I.6. Estructura del hexámero de la globulina 11S (Adachi y col., 2003). (a) Se muestran los seis polipéptidos que la conforman (ácidos: A1, A2 y A3, y básicos: B1, B2 y B3); (b) Molécula rotada 90°.*

Marcone y col. (1994), mediante microscopía electrónica, obtuvieron información de la estructura cuaternaria de la globulina 11S que apoyó el modelo consistente en un dodecámero con sus subunidades organizadas en dos anillos hexagonales ubicados paralelamente resultando en un cilindro oblato con un orificio central. Esta estructura, similar a la propuesta para glicinina de soja (Badley y col., 1975), con una simetría D<sub>6</sub> tiene las siguientes dimensiones: 2,8 nm desde el centro del complejo al centro de la subunidad, 2,8 nm entre subunidades de un anillo y 3,2 nm entre subunidades de anillos opuestos. Cada uno de los anillos tiene un diámetro externo de 9 nm. Los hexámeros están formados por subunidades de masas moleculares entre 50 y 70 kDa que se mantienen unidas por interacciones no covalentes. Cada una de las subunidades, a su vez, está formada por un polipéptido ácido (peso molecular de 30 a 40 kDa) y un polipéptido básico (peso molecular alrededor de 20 kDa) unidos por enlace disulfuro (Adachi y col., 2001; Segura Nieto y col., 1994) (**Esquema I.6**).

*Globulina-p*. Konishi y col. (1991) describieron una fracción proteica que era extraída con agua en una etapa posterior a la extracción de globulinas y albúminas-1. Estos autores denominaron a la nueva fracción proteica albúminas-2. Según los datos informados por Konishi y col. (1991), las albúminas-2 se solubilizan en agua o en soluciones salinas de baja fuerza iónica (concentración de NaCl menor a 0,1 M). Su punto isoeléctrico aparente está entre 5 y 6. A diferencia de las albúminas-1, esta fracción está formada por 5 polipéptidos de masas moleculares: 56, 36, 31, 26 y 22 kDa. Las masas de los polipéptidos que constituyen a la fracción albúmina-2 son similares a las de los polipéptidos que forman la fracción globulinas excepto por la abundante cantidad del polipéptido de 56 kDa. El aminoácido más importante que integra a las albúminas-2 es el ácido glutámico/glutamina (Glx). Al comparar ambas fracciones de albúminas, las albúminas-2 son más ricas en prolina, serina, arginina, histidina y fenilalanina y menos en lisina, metionina, cisteína y valina. La resistencia al ataque de pronasa que ofrece la fracción albúmina-2, a diferencia de lo que se observa para albúmina-1 cuando la harina es tratada con dicha enzima, permitió sugerir a Konishi y col. (1991) que la primera se encontraría resguardada en cuerpos proteicos, dato que fuera confirmado posteriormente por Nakamura y col. (1998). En nuestro laboratorio, se aisló una fracción proteica con características de extracción similares a las descritas por Konishi y col. (1991) para la fracción albúmina-2. El perfil de polipéptidos obtenido en condiciones no reductoras fue similar al de la globulina 11S (Martínez y col., 1997) y al analizarla en presencia de un agente reductor, se observó un perfil equivalente al informado para albúminas-2 (Konishi y col., 1991). Una particularidad de esta proteína es su capacidad para formar y estabilizar agregados de alto peso molecular (600-1500 kDa) (Castellani, 2000), sólo una pequeña proporción de sus moléculas está libre, para las cuales se ha determinado una masa molecular próxima a 300 kDa (Martínez y col., 1997, Castellani, 2000) siendo esta otra característica que comparte con globulina 11S. Evaluando todas estas características se propuso para esta fracción la denominación de globulina

polimerizada (globulina-p o gp). Se ha determinado que los agregados característicos de globulina-p se encuentran parcialmente estabilizados por enlaces disulfuro (Martínez y col., 1997). Al aislar esta proteína en presencia de bajas concentraciones de un agente reductor (2-mercaptoetanol 20 mM) y analizarla por cromatografía de exclusión molecular utilizando la misma concentración del agente reductor, se observó una disminución en la cantidad de agregados. La globulina-p parcialmente purificada presentó una elevada estabilidad térmica, con una  $T_d = 94\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Martínez y col., 1997). Al analizar la respuesta de esta fracción proteica cuando es sometida a diferentes condiciones de pH (Castellani y col., 1998) se encontró una región de máxima estabilidad térmica en una zona de pHs cercana a la neutralidad (pH 6,0-8,0). Mientras que a pHs extremos, la fracción globulina-p se encuentra desnaturalizada, siendo esta desnaturalización más importante en la zona ácida. Utilizando un método alternativo de extracción secuencial, Chen y Paredes López (1997) obtuvieron una fracción proteica que clasificaron como globulina 11S. Sin embargo, las propiedades fisicoquímicas y la composición polipeptídica mostraron rasgos en común con globulina-p (Romero Zepeda y Paredes López, 1996). Gorinstein y col. (2001) analizaron esta fracción proteica no purificada mediante fluorescencia intrínseca (FI) y dicroísmo circular (DC) en condiciones nativas, asignándole una mayor exposición de los residuos de triptófano en la superficie y una mayor hidrofobicidad superficial en comparación con otras globulinas. En cuanto a la estructura secundaria de globulina-p, se encontró aproximadamente un 15 % de  $\alpha$  hélice, 25 % de hoja  $\beta$  y el resto correspondió a estructura sin periodicidad. Cuando globulina-p fue tratada con papaína (Castellani y col., 2000) los polipéptidos con masa molecular 56 kDa (M) y los polipéptidos ácidos (A) fueron atacados en mayor medida por la enzima mientras que las subunidades básicas conservaron el mismo tamaño. Estos resultados permitieron sugerir a los autores que tanto A como M estarían localizados en la superficie de la molécula. Estudios inmunoquímicos realizados sobre esta fracción proteica por Aphalo y col. (2004), revelaron que la moléculas de globulina-p y sus agregados tienen superficies reactivas similares. Por otra parte el polipéptido de 56 kDa fue el de mayor reactividad, seguido por los polipéptidos ácidos. Globulina-p presentó reacción cruzada con las restantes fracciones de amaranto, siendo la globulina 11S la más reactiva. También se observó reacción cruzada con globulinas de quinoa y en menor grado con globulinas de girasol y arroz. Estudios recientes realizados por Molina y col. (2008) demostraron que el polipéptido característico de globulina-p de 56 kDa se trata de una subunidad no procesada aunque posee el sitio de corte característico asparagina-glicina presente en las globulinas 11S y ha sido demostrado que existe actividad de la enzima de procesamiento vacuolar (VPE) tanto en semillas de amaranto en desarrollo como en semillas maduras. De este modo, los resultados obtenidos por estos autores, no han podido esclarecer cual es la causa de la presencia del precursor no procesado en las semillas maduras.

*Glutelinas*: constituyen la fracción proteica más insoluble obtenida a partir de harina de semillas, sólo son extraídas en condiciones drásticas de pH. Generalmente se utiliza buffer borato de pH =

10 y en algunos casos se agregan detergentes y/o agentes reductores para aumentar el rendimiento de extracción (Segura Nieto y col., 1994; Paredes López y col., 1993). También se utiliza NaOH 0,1 N para la extracción de esta fracción con el que se obtiene un rendimiento mayor (Abugoch y col., 2003). Existe una importante variabilidad en los datos informados por distintos autores para el rendimiento de extracción de esta fracción abarcando un rango entre 7 y 56 %. En cuanto a su composición aminoacídica, el ácido glutámico/glutamina es el aminoácido más abundante, le siguen arginina, leucina, fenilalanina y tirosina (Bressani y García Vela, 1990). Su perfil electroforético es similar al descrito para globulina-p (Martínez y col., 1997, Abugoch y col., 2003). En condiciones no reductoras las principales bandas detectadas para esta fracción se encuentran entre 50-67, 30-38 y 20-28 kDa, además de algunas de mayor masa molecular que no entran en el gel de separación. En presencia de un agente reductor como el 2-mercaptoetanol, se encontraron polipéptidos de masa molecular similar a los de globulinas, se detectó una banda entre 54-60 kDa, y entre dos y tres bandas en las regiones de 35-38 kDa y 24-26 kDa, junto con una baja proporción de polipéptidos agregados (Gorinstein y col., 1998 y 1991; Barba de la Rosa y col., 1992, Martínez y col., 1997). La disminución de los agregados de alta masa molecular al pasar de condiciones no reductoras a condiciones reductoras indicó que estaban formados y estabilizados por uniones disulfuro (Abugoch y col., 2003). Estos autores encontraron cierto grado de plegamiento para las glutelinas de amaranto cuando eran extraídas con buffer borato (pH = 10), mientras que están completamente desnaturalizadas cuando se extraen con NaOH 0,1 N. Estudios inmunoquímicos han determinado la existencia de cierta homología entre las subunidades ácidas de globulinas y los polipéptidos de 32 y 60 kDa de glutelinas de amaranto. Además se determinó cierto grado de homología entre estos polipéptidos y los de globulina de avena y glutelina de arroz (Vasco Méndez y Paredes López, 1995); y entre la fracción globulina-p y glutelinas de amaranto (Aphalo y col., 2004).

*Prolaminas:* comprenden a las proteínas solubles en soluciones alcohólicas, en general se utiliza una concentración de 70 % de isopropanol para su extracción. El valor máximo informado para el rendimiento de esta fracción fue del 11 % (Duarte Correa y col., 1986). A pesar de las diferencias, todos los autores encuentran a esta fracción como la minoritaria. Existen también algunas discrepancias en cuanto a las masas de los polipéptidos principales que forman a las prolaminas de amaranto. Gorinstein y col. (1991) informaron que las bandas mayoritarias tienen una masa entre 10 y 14 kDa y en menor proporción una de 20 kDa. Segura Nieto y col. (1992) encontraron tres bandas principales a 16, 18 y 22 kDa y dos bandas menores debajo de 12 kDa. Por otra parte, Barba de la Rosa y col. (1992) informaron que en ausencia de un agente reductor, se observan bandas de alto peso molecular que en presencia del agente reductor, se transforman en 67, 34 y 22 kDa. Estas diferencias podrían explicarse en parte por los cambios que sufren las prolaminas de acuerdo al solvente empleado para el desgrasado de la harina (Segura Nieto y col., 1994) y a las condiciones que se utilizan para su extracción. Dentro de los aminoácidos

esenciales, la treonina y la leucina (Segura Nieto y col., 1992) son los que se encuentran en mayor proporción en estas prolaminas, al igual que los aminoácidos azufrados y la fenilalanina (Barba de la Rosa y col., 1992). Las características estructurales e inmunoquímicas de las prolaminas de amaranto están alejadas de las gliadinas de trigo, cebada y centeno, por lo que no presentan contraindicación en pacientes celíacos.

### **Proteínas y péptidos bioactivos de amaranto.**

La semilla presenta características nutricionales y promotoras de la salud muy interesantes (Montoya Rodríguez y col. 2015). Entre sus componentes bioactivos estudiados pueden mencionarse polifenoles (rutina, isoquercetina, nicotiflorina, ácidos fenólicos) con efectos antioxidantes; fibra dietaria; hidrolizados proteicos que inhiben la enzima convertidora de angiotensina (ACE) (efecto antihipertensivo); el péptido lunasina con propiedades antitumorales; extractos metanólicos con actividades antihiperlipidémica, antidiabética y antihelmíntica y extractos acuosos con actividades antidiarreica, antifúngica y antimalaria, entre otros (Huerta Ocampo y Barba de la Rosa 2011; Venskutonis y Kraujalis, 2013). Además se ha demostrado el efecto reductor de colesterol de dietas basadas en semillas de amaranto extruidas, el cual se atribuye a la presencia de fibra soluble y proteínas en dichas preparaciones (Plate y Areas, 2002). En nuestro laboratorio se han estudiado y demostrado una gran variedad de actividades de péptidos de amaranto: actividad antihipertensiva (Vecchi y Añon, 2009, Quiroga, y col., 2017 y Suárez y col., 2019), actividad antitumoral (Barrio y Añon, 2009), actividad antitrombótica (Sabbione y col., 2016). En cuanto a las propiedades antioxidantes del amaranto, este tipo de actividad ha sido atribuida a los componentes polifenólicos y al escualeno presente en la planta (Amin y col., 2006; Conforti y col., 2005; Nsimba y col., 2008). Por otra parte, esta actividad también se ha estudiado en nuestro laboratorio demostrando la presencia en las semillas de *Amaranthus mantegazzianus* de péptidos y polipéptidos con capacidad de capturar radicales libres y de inhibir la oxidación del ácido linoleico, aumentando dichas actividades luego de hidrolizar de manera extensiva las proteínas presentes en un aislado proteico con la enzima alcalasa (Tironi y Añon, 2010). Asimismo, tanto el aislado como el hidrolizado proteico de amaranto han sido sometidos a una simulación de la digestión gastrointestinal, obteniéndose péptidos con una interesante capacidad para neutralizar diferentes radicales libres presentes en el organismo (Orsini Delgado y col., 2011). También se ha estudiado el efecto de la incorporación de aislado de amaranto en el perfil lipídico, la presión sanguínea y el estado antioxidante de ratas Wistar (Lado y col., 2015).

## **OBJETIVO GENERAL**

En estudios realizados previamente en nuestro laboratorio se demostró que la digestión gastrointestinal simulada del aislado proteico de amaranto produjo la liberación de péptidos que presentaron la capacidad de actuar frente a diversas especies reactivas normalmente presentes en nuestro organismo, especialmente frente al peroxinitrito y a los radicales peroxilo e hidroxilo, determinadas en ensayos in vitro químicos (acelulares). Asimismo, pudo comprobarse que una hidrólisis con alcalasa previa a la digestión gastrointestinal no mejoraría dichas propiedades (Orsini Delgado y col., 2011; Orsini Delgado y col., 2015). Además, se han podido identificar algunos péptidos derivados de la digestión gastrointestinal del aislado proteico de amaranto que presentaron capacidad de neutralizar radicales peroxilo (Orsini Delgado y col., 2016). Estos estudios fueron realizados utilizando un método estático de digestión gastrointestinal in vitro que fue optimizado para digerir aislado proteico de amaranto y, por lo tanto, focalizado en la digestión de proteínas. Asimismo, se realizó una primera aproximación a la evaluación in vivo del efecto antioxidante producido por el consumo de aislado proteico de amaranto (Lado y col., 2015).

### **Objetivo general**

*Profundizar el conocimiento ya adquirido y aportar mayor evidencia científica en la evaluación de aislado proteico de amaranto como potencial ingrediente funcional antioxidante. La comprobación de este tipo de propiedades en el amaranto, además de su conocida calidad nutricional, podría impulsar el cultivo de esta especie emergente, con buen impacto económico en regiones de suelos pobres de nuestro país.*

### **Objetivos específicos**

Dado que la comprobación de un efecto beneficioso para la salud de un ingrediente alimentario requiere de una diversidad de estudios y teniendo en cuenta los estudios previamente realizados, se proponen los siguientes objetivos específicos:

#### **A. Estudios *in vitro*:**

- I. Profundizar el estudio de la actividad antioxidante de péptidos de amaranto generados por la digestión gastrointestinal simulada de aislado, evaluando su acción sobre distintos sistemas ex vivo tales como lipoproteínas de baja densidad (LDL) y en cultivos celulares, utilizando diversas metodologías.*
- II. Evaluar la aplicación de distintos protocolos de digestión gastrointestinal simulada sobre la generación de péptidos antioxidantes.*
- III. Evaluar la potencial absorción de los péptidos activos a fin de valorar su potencial acción en el organismo.*
- IV. Analizar posibles mecanismos de acción y correlacionarlos con propiedades de*

*los péptidos.*

B. Estudios *in vivo*:

*V. Evaluar la actividad antioxidante in vivo de aislado proteico de amaranto adicionado a la dieta de ratas*



## **PARTE I. ESTUDIOS *IN VITRO***

## **CAPÍTULO 1**

# **PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MUESTRAS. DIGESTION GASTROINTESTINAL SIMULADA DE AISLADO PROTEICO DE AMARANTO.**

## INTRODUCCIÓN

### **Digestión gastrointestinal de proteínas**

La digestión de los alimentos comienza en la boca donde estos entran en contacto con la saliva durante un tiempo muy corto (desde algunos segundos hasta pocos minutos) con un pH que varía entre 6,2 y 7,4. Ocurre una disgregación mecánica y, en el caso de algunos componentes alimentarios (no las proteínas), enzimática ya que la saliva contiene  $\alpha$ -amilasa (Guyton y Hal, 1991, Kedjardune, y col., 1997). El proceso digestivo continúa en el estómago, donde el jugo gástrico tiene un pH entre 1,5 y 2 (Charman y col., 1997) aunque luego de la ingesta de alimentos, se produce un aumento temporal del pH entre 3 y 7, por los efectos buffer y de dilución que provocan los componentes alimentarios ingeridos (Dressman y col., 1990, Charman, y col., 1997). El tiempo de vaciado del estómago puede variar entre 15 minutos y 3 horas. Al entrar el alimento en contacto con un pH ácido y con enzimas líticas, se disocian las fibras de colágeno y se desnaturalizan las proteínas presentes, mientras que además ocurre una acción mecánica por las contracciones del estómago. El jugo gástrico es una mezcla de secreciones de varias células epiteliales especializadas, su composición consiste principalmente en agua, ácido clorhídrico, trazas de cloruro de potasio, cloruro de sodio, bicarbonato de sodio, mucus y enzimas. El mucus es un gel viscoso que recubre las superficies mucosas del tracto gastrointestinal. Sus características se deben a glicoproteínas denominadas mucinas que son el producto orgánico principal secretado por las células de la superficie epitelial. Los monómeros de mucina son glicoproteínas con una masa molecular de aproximadamente 50 kDa, altamente glicosidados. Además del moco turbio visible, las células superficiales secretan un fluido rico en bicarbonato de sodio, el cual actúa como un medio de protección al bajo pH y las condiciones pépticas del lumen gástrico. La principal enzima del jugo gástrico es la pepsina, aunque existen otras enzimas importantes en cantidades mucho menores, tal como la lipasa gástrica, que es la más efectiva para hidrolizar triglicéridos con ácidos grasos de cadena corta; todas ellas derivadas de las células principales o células zimógenas (Johnson, 2002). La pepsina gástrica es en realidad un conjunto heterógeno de proteínas responsables de la actividad proteolítica. Éstas son secretadas en forma de precursores zimógenos inactivos llamados pepsinógenos, el pepsinógeno I (PGI) y el pepsinógeno II (PGII); estas variantes moleculares se diferencian en carga neta y/o peso molecular (isozimas) y al entrar en contacto con el medio ácido del jugo gástrico se activan. La pepsina es una proteasa aspártica con amplia especificidad, que tiene preferencia de escisión en péptidos con residuos aromáticos o L-aminoácidos dicarboxílicos; corta preferentemente el extremo C-terminal en fenilalanina y leucina (Burrell, 1993) y escinde fácilmente uniones entre leucina-serina, leucina-treonina y serina-triptofano (Schmelzer y col., 2007). Esta enzima alcanza su mayor actividad a valores de pH entre 2 y 3 y se vuelve inactiva cuando el pH supera el valor de 5. Una de las características esenciales de la digestión proteica con pepsina es su capacidad para digerir el colágeno, el cual es poco afectado por el resto de las enzimas digestivas; el

colágeno es un componente importante del tejido conjuntivo intercelular de las carnes, y es esencial su digestión para que otras enzimas digestivas puedan penetrar en esta matriz y digerir sus proteínas celulares. La pepsina sólo inicia la digestión de las proteínas y contribuye con un 10 a 20 % del proceso total de conversión de estas macromoléculas en sus productos de digestión (Johnson, 2002).

La mayor parte de la digestión proteica tiene lugar en la parte proximal del intestino delgado, es decir, en el duodeno y en el yeyuno, por efecto de las enzimas proteolíticas de la secreción pancreática. El páncreas secreta entre 1500 y 3000 mL diarios de jugo pancreático, líquido isoosmótico alcalino ( $\text{pH} = 8$ ) compuesto principalmente de agua, sales minerales y varias proteínas entre las que se incluyen mucinas y alrededor de 20 enzimas y proenzimas, necesarias para la actividad digestiva intestinal. Entre los principales componentes inorgánicos se encuentran el sodio, potasio, cloruro, calcio, zinc, fósforo y sulfato. Desde el punto de vista fisiológico, el bicarbonato es el ion de mayor importancia segregado por el páncreas, cuya función es neutralizar el quimo ácido proveniente del estómago y proveer el pH adecuado para el funcionamiento de las enzimas pancreáticas (Johnson, 2002). El páncreas secreta enzimas amilolíticas, lipolíticas y proteolíticas. Las enzimas amilolíticas, como la  $\alpha$ -amilasa, hidrolizan el almidón produciendo oligosacáridos y maltosa. Las enzimas lipolíticas comprenden la lipasa, fosfolipasa A y la colesterolesterasa. En el duodeno, los lípidos son emulsionados por las sales biliares provenientes del hígado a fin de poder ser atacados por las enzimas. Para ello, la lipasa requiere de la interacción con la colipasa que es otro constituyente del jugo pancreático, favoreciendo su unión a las gotitas de lípidos emulsionados. Por otra parte, el páncreas también secreta ribonucleasas y desoxirribonucleasas, que degradan los ácidos nucleicos para formar nucleótidos libres. Las enzimas proteolíticas son secretadas como proenzimas inactivas. La enteropeptidasa, una enzima que se encuentra en la mucosa duodenal, rompe un enlace lisina-isoleucina del tripsinógeno para formar tripsina, la cual a su vez continúa activando tripsinógeno para que produzca más tripsina, y también transforma el quimotripsinógeno y las procarboxipeptidasas A y B en sus enzimas activas. Algunas de estas enzimas proteolíticas son endopeptidasas, como la tripsina y la quimotripsina, que hidrolizan las moléculas proteicas en pequeños polipéptidos, actuando sobre enlaces peptídicos internos; mientras que otras son exopeptidasas que actúan sobre los extremos terminales libres de las proteínas. Las carboxipeptidasas actúan sobre los extremos carboxilo terminal de las proteínas y polipéptidos. La proelastasa da origen a la elastasa que digiere las fibras de elastina que mantienen la arquitectura de las carnes y de otras matrices. Las endopeptidasas tripsina, quimotripsina y elastasa tienen diferente especificidad de sustrato; solo son activas a pH neutro y el mecanismo de catálisis de estas enzimas implica un residuo de serina esencial. La tripsina es específica para aminoácidos cargado positivamente (Arg y Lys), la quimotripsina corta enlaces peptídicos donde el carbonilo del enlace peptídico pertenece a grupos aromáticos grandes y/o hidrofóbicos (Phe, Trp, Tyr, Met y Leu) (Devlin, 2009). Las enzimas pancreáticas sólo degradan un pequeño porcentaje de las proteínas hasta sus aminoácidos

constituyentes. La mayoría permanecen en forma de dipéptidos y tripéptidos o incluso moléculas mayores (Adler, 1997; Wiseman y col., 2000). El pH intestinal va variando desde 4,5 en el duodeno hasta 7,5 en el íleon (Daugherty y Mrsny, 1999). Por lo general, el quimo alimenticio permanece entre 30 y 45 minutos en el duodeno con un pH que varía entre 4 y 5,5; luego en el yeyuno puede permanecer entre 90 y 120 minutos, con una variación del pH entre 5,5 y 7; y, por último, en el íleon el tiempo de permanencia puede ser entre 5 y 7 horas, con una variación del pH entre 7 y 7,5 (Vermeirssen y col., 2003). Estos tiempos dependerán de las cantidades relativas de alimento, agua y secreciones intestinales y del grado de digestión que haya ocurrido hasta el momento.

El paso final de la digestión de las proteínas ocurre en la luz intestinal y está encomendado a los enterocitos que revisten las vellosidades del intestino delgado, sobre todo en el duodeno y el yeyuno. Estas células tienen un borde en cepillo formado por miles de microvellosidades que se proyectan desde la superficie de cada célula. La membrana celular de cada una de estas microvellosidades contiene múltiples peptidasas que sobresalen de la membrana y entran en contacto con los líquidos intestinales (Jhonson, 2002). Existen dos tipos de peptidasas de especial importancia, las aminopeptidasas y las dipeptidasas que continúan la degradación de los polipéptidos resultantes a tripéptidos o dipéptidos y algunas incluso liberan aminoácidos.

Un alto porcentaje de los productos finales de la digestión de proteínas absorbidas son aminoácidos, la absorción de péptidos ocurre en baja proporción y la de moléculas proteicas completas es aún mucho menor. Sin embargo, se ha observado que es posible la absorción de péptidos de cadenas cortas en porcentajes bajos, en muchos casos menor al 1 % (Vermeirssen y col., 2003; Regazzo y col., 2010). Por último, en el citosol de los enterocitos, existen otras muchas peptidasas específicas que pueden completar la digestión de los péptidos que ingresan a estas células (Pappenheimer y col., 1994). El tema de la absorción intestinal de péptidos será desarrollado más ampliamente en el Capítulo 4 de esta Tesis.

### **Simulación *in vitro* de la digestión gastrointestinal**

Las proteínas alimentarias son fuente de una gran variedad de péptidos bioactivos, los cuales se encuentran encriptados dentro de estas proteínas y pueden ser liberados durante el procesamiento de los alimentos o *in vivo* durante la digestión gastrointestinal. Dichos péptidos podrían ejercer su acción en el sistema gastrointestinal o, luego de su absorción, sobre diversos órganos o sistemas blanco de nuestro organismo (Satake y col., 2002). A fin de evaluar *in vitro* la posible liberación de péptidos con diferentes propiedades, en este caso en particular péptidos con actividad antioxidante, es importante realizar estudios de simulación de la digestión gastrointestinal de las proteínas.

Los métodos *in vitro* que simulan procesos de digestión son ampliamente utilizados para estudiar el comportamiento gastrointestinal de alimentos o productos farmacéuticos. Aunque los estudios nutricionales en humanos todavía se consideran el mejor modelo a la hora de abordar cuestiones

relacionadas con la dieta, los métodos *in vitro* tienen la ventaja de ser más rápidos, menos costosos, menos intensivos en mano de obra, permiten que se mida un número relativamente grande de muestras en paralelo y principalmente, no presentan restricciones éticas. La reproducibilidad, la elección de las condiciones controladas y el fácil muestreo en el sitio de interés hacen que los modelos *in vitro* sean muy adecuados para los estudios mecanísticos y la construcción de hipótesis (Minekus y col., 2014). Idealmente, un modelo *in vitro* debería ofrecer las ventajas de un muestreo rápido y representativo en cualquier punto del tiempo, probando toda la matriz alimentaria (o dieta) en lugar de la proteína aislada y ser capaz de manejar alimentos sólidos que no pueden ser probados fácilmente *in vivo* (Wickham y col., 2009).

Existen muchos protocolos diferentes para estudiar la digestión gastrointestinal *in vitro*, los cuales difieren en el número y tipo de pasos involucrados en la digestión (boca, estómago, intestino delgado, intestino grueso); la composición de fluidos digestivos (enzimas, sales, buffers, polímeros biológicos); y los esfuerzos mecánicos y el flujo de fluidos (magnitud y dirección de las fuerzas mecánicas, perfiles de flujo y geometría de flujo) utilizados en cada paso. También existen diferencias entre los parámetros experimentales medidos luego o durante la digestión, los cuales pueden incluir cambios químicos (hidrólisis de lípidos, proteínas o polisacáridos, por ejemplo), cambios de locación (liberación de compuestos encapsulados, procesos de adsorción competitiva) o cambios estructurales (rotura de uniones específicas, agregación, coalescencia) (Hur y col., 2011).

Las enzimas y otras moléculas biológicas utilizadas en la mayoría de estos ensayos son la pepsina, pancreatina, tripsina, quimotripsina, peptidasa,  $\alpha$ -amilasa, lipasa, sales biliares y mucina. Distintos factores como la concentración de las enzimas, la relación enzima/sustrato, la temperatura, el pH, la estabilidad, la presencia de inhibidores y los tiempos de incubación afectan la actividad enzimática (Boisen y Eggum, 1991). Abdel-Aal (2008) estableció que la elección de las enzimas proteolíticas, de las condiciones de digestión y de los métodos para analizar los hidrolizados proteicos tiene un efecto muy importante sobre la digestibilidad proteica y va a depender principalmente del objetivo del estudio. Las diferencias en la digestibilidad también dependen de la fuente proteica (vegetal/animal, cruda/procesada) y que un aumento en la cantidad de proteína dietaria provocaría un aumento en la secreción de enzimas proteolíticas pancreáticas, por lo que las características de la digestión gastrointestinal *in vitro*, tales como el tiempo de digestión y el contenido y composición enzimática, deben ser ajustados de acuerdo a las características de las muestras en estudio.

Si bien las correlaciones entre los estudios *in vitro* y lo que ocurre realmente *in vivo* son extremadamente importantes (Fatouros y Mullertz, 2008), son pocos los estudios que han evaluado dicha correlación en muestras de origen alimentario y, en especial, sobre las proteínas dietarias. A pesar de que el mecanismo de digestión en el organismo humano se encuentra ampliamente estudiado, resulta muy difícil reproducir las condiciones a las que se enfrenta un alimento cuando ingresa al mismo, lo cual se debe a la gran cantidad y variedad de enzimas y

electrolitos, a las variaciones de pH y de concentración de otras especies, como así también a todos los sistemas de regulación que posee el organismo y a los movimientos estomacales e intestinales intrínsecos.

- *Modelos estáticos de digestión in vitro*

En las últimas décadas se han desarrollado varios métodos *in vitro* para simular las condiciones fisiológicas (temperatura, agitación, pH, enzima y composición química) y la secuencia de eventos que ocurren durante la digestión en el tracto gastrointestinal humano. Los métodos estáticos (también llamados métodos bioquímicos) son las técnicas más simples en este sentido e incluyen dos o tres etapas de digestión (oral, gástrica e intestinal) cuyos productos permanecen en gran parte inmóviles en un único biorreactor estático. Estos métodos simulan un número limitado de parámetros de digestión fisiológica (que se describirán a continuación) y no imitan procesos físicos como cizallamiento, mezcla, hidratación, cambios en las condiciones a lo largo del tiempo o peristalsis (Verhoeckx y col., 2015).

El proceso en la boca dura desde unos pocos segundos hasta minutos, y dado que el valor del pH salival es casi neutro, no se espera una modificación significativa de los alimentos en esta etapa. Por esto, la mayoría de los métodos solo incluyen las fases gástrica e intestinal de la digestión, y el procesamiento oral es quizás el más difícil de simular en el caso de alimentos sólidos. En lugar de tal procesamiento, normalmente se utiliza un paso de homogeneización, aunque esto no crea un bolo alimenticio tal cual ocurre *in vivo*. En el caso de alimentos líquidos o componentes aislados de alimentos, no se realiza la fase de homogeneización y formación del bolo, aunque se puede agregar amilasa salival (Moreda-Piñeiro y col., 2011). Por ejemplo, en estudios sobre la hidrólisis de proteínas no existe una acción enzimática significativa en la boca (Wickham y col., 2009), aunque se ha aplicado una fase oral para otros componentes. La fase gástrica se realiza con HCl (o HCl-pepsina) bajo condiciones fijas de pH y temperatura, durante un tiempo establecido. El alimento se homogeneiza en solución acuosa y normalmente se agrega pepsina después del ajuste a pH 1-2. La muestra se incuba a 37 °C durante 1-3 horas, manteniendo el pH constante. Algunos autores agregan mucina en el paso gástrico para simular mejor las secreciones fisiológicas (Verhoeckx y col., 2015). La digestión intestinal necesita neutralización posterior (generalmente con NaOH o NaHCO<sub>3</sub>) e incubación con enzimas pancreáticas, con o sin sales biliares como emulsionantes. Dado que la mayoría de los nutrientes se absorben en el yeyuno y el íleon, es razonable que el ajuste de pH se realice a valores cercanos a 7. Este ajuste de pH va acompañado normalmente de una temperatura de 37 °C durante 1-5 h (Ekmekcioglu, 2002). Los compuestos lipofílicos (carotenoides, esteroides vegetales, etc.) se incorporan en liposomas y fases micelares durante la digestión intestinal por lo que es común el agregado de lipasa pancreática humana y otras enzimas específicas (colesterol esterasa, fosfolipasa A2, co-lipasa, etc.) para lograr mejores condiciones fisiológicas.

En estudios que utilizan métodos estáticos, la elección de las enzimas y las condiciones de incubación está condicionada por el objetivo del estudio. Por lo tanto, la aplicación de tales

métodos a la evaluación de la digestión de un solo nutriente condiciona el uso de una sola enzima, por ejemplo, proteína-pepsina, almidón- amilasa o lípido-lipasa. El uso de una sola enzima purificada ofrece la ventaja de facilitar la estandarización del modelo *in vitro*, lo que permite obtener resultados que son más reproducibles entre los diferentes laboratorios. Sin embargo, la digestión de un nutriente está influenciada por otros componentes alimentarios y, por consiguiente, el uso de mezclas complejas de enzimas proporciona resultados que reflejan más fielmente la situación real *in vivo* que la utilización de enzimas purificadas individuales. Las enzimas se obtienen de humanos, aunque varios estudios consideran que es posible reemplazar la pepsina humana, la lipasa pancreática y la co-lipasa por enzimas de otro origen como las porcinas (Hur y col., 2011).

Durante la digestión péptica y pancreática, las muestras a menudo se incuban en un baño de agua con agitación continua, aunque no todos los estudios indican las condiciones utilizadas. Se ha informado el desarrollo de un dispositivo estático (Chen y col., 2011) que permite la agitación con una sonda esférica, aplicando un movimiento vertical dentro del vaso para crear un patrón de flujo similar al de las ondas de contracción de la pared del estómago.

Los modelos estáticos son particularmente útiles cuando hay una digestión limitada (por ejemplo, pasos gástricos y/o intestinales), pero son menos aplicables en los estudios de digestión total, incluida la fermentación colónica. Los modelos estáticos se utilizan predominantemente para estudios de digestión en alimentos simples y componentes de alimentos aislados o purificados. Dichos estudios no solo contribuyen a mejorar las propiedades alimentarias (nutricionales o sensoriales) sino que también constituyen ensayos preliminares que aportan evidencias referidas a posibles declaraciones nutricionales y de propiedades saludables, ya que se debe demostrar que la sustancia se digiere y está disponible para ser utilizada por el organismo (Fernández-García y col., 2009). Sin embargo, a pesar de su potencial y amplia aplicabilidad, ninguno de los modelos estáticos reproduce el entorno dinámico del intestino. No pueden evaluar la absorción, ni la cinética de transporte, ni medir la competencia de nutrientes o componentes de los alimentos en el sitio de absorción como ocurre *in vivo*, aunque pueden realizarse aproximaciones a estos procesos, según el esquema experimental aplicado:

- Digestión *in vitro* de alimentos homogeneizados en un sistema cerrado y determinación de la fracción de nutrientes solubles.
- Digestión *in vitro* y diálisis de nutrientes solubles a través de una membrana semipermeable con un tamaño de poro específico con o sin eliminación de los nutrientes dializados.
- Digestión *in vitro* y uso de células Caco-2 para medición de: a) la absorción celular de los nutrientes generados durante la digestión intestinal previo proceso de diálisis, o b) transporte transepitelial de nutrientes solubilizados obtenidos a partir de los digeridos (Ekmekcioglu, 2002).

Son modelos que carecen de la barrera mucosa compleja con todos sus procesos reguladores, particularmente control hormonal y nervioso, mecanismos de retroalimentación, actividad de las células de la mucosa, complejidad de los movimientos peristálticos, vaciamiento gástrico o



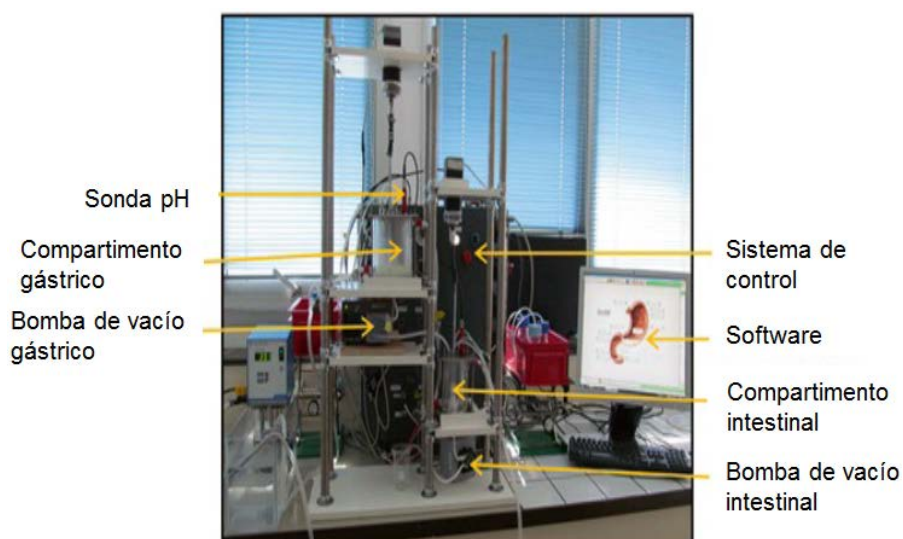
cambios continuos en las tasas de flujo de secreción y pH, participación del sistema inmune local, efectos de la microflora intestinal y metabolismo hepático. Además, los factores que influyen en la biodisponibilidad de un nutriente o compuesto bioactivo, como estado nutricional, edad, genotipo, estado fisiológico o infecciones crónicas y agudas no pueden evaluarse en ensayos estáticos *in vitro* (Verhoeckx y col., 2015).

Como ya se ha mencionado, se han propuesto una gran diversidad de modelos diferentes de digestión, lo que a menudo impide la posibilidad de comparar resultados entre distintos grupos de investigación. La acción COST INFOGEST es una red internacional de más de 200 científicos de 32 países que trabajan en el campo de la digestión. Uno de los objetivos de la red ha sido consolidar las condiciones para la digestión simulada de alimentos y obtener un consenso para un modelo de digestión. El objetivo es describir un conjunto de condiciones que están cerca de la situación fisiológica, que pueden servir como una sugerencia básica para abordar diversos interrogantes. Se pueden necesitar modificaciones adicionales de estas condiciones sugeridas, por ejemplo, para simular la digestión en bebés o ancianos, que pueden diferir considerablemente en la concentración de enzimas. El método recomendado por esta red está basado en las condiciones fisiológicas e incluye una fase oral, una gástrica y una intestinal; cada una de ellas contiene soluciones de electrolitos completas con enzimas específicas. La fase intestinal cuenta además con la presencia de las sales biliares. En este método se tiene en cuenta la digestión de todos los macrocomponentes y puede ser aplicado a diversas matrices (Minekus y col., 2014; Verhoeckx y col., 2015). Las principales limitaciones de este modelo simplificado son el pH fijo y la duración de las diversas fases. Sin embargo, esto también puede verse como una ventaja en términos de consistencia y comparabilidad. El otro problema potencialmente problemático es la falta de un paso de absorción, pero existen actualmente una serie de sistemas celulares en los que se puede investigar este aspecto, como se desarrollará en el Capítulo 4.

#### - Modelos dinámicos de digestión *in vitro*

Si bien los modelos estáticos tienen muchas ventajas, funcionan principalmente para imitar los procesos bioquímicos en el tracto gastrointestinal y generalmente usan un conjunto único de condiciones iniciales (pH, concentración de enzimas, sales biliares, etc.) para cada etapa. Sin embargo, este enfoque a menudo no es una simulación real de las condiciones *in vivo* más complejas, donde el entorno bioquímico cambia constantemente y los parámetros físicos como las fuerzas de cizalladura y de desintegración pueden tener un gran impacto en la descomposición de partículas de alimentos más grandes y liberación de nutrientes (Verhoeckx y col., 2015). Se han desarrollado varios modelos dinámicos de digestión para abordar estos aspectos complejos de la digestión y acercarse a la realidad fisiológica. Estos modelos son mucho más sofisticados que los estáticos e incluyen un flujo dinámico de los alimentos y regulación del pH y de la concentración de enzimas digestivas en los diferentes compartimentos. Uno de los sistemas más conocidos en el mercado es el modelo desarrollado por la organización holandesa TNO (TNO innovation for life, <https://www.tno.nl/en/>), llamado TIM1 (Minekus y col., 1995). Este sistema altamente sofisticado

se compone de 4 compartimentos en serie que simulan el estómago y los 3 segmentos del intestino delgado, es decir, el duodeno, el yeyuno y el íleon. Las diferentes partes están hechas de vidrio con una pared flexible en el interior. El agua circula en el espacio entre la camisa de vidrio y la pared flexible y los movimientos peristálticos se logran al cambiar la presión sobre el agua. Este sistema condujo a un progreso significativo en la comprensión del mecanismo de desintegración de los alimentos durante la digestión y se ha aplicado a una amplia gama de alimentos (Ménard y col., 2014). Se ha desarrollado también el sistema TIM2 que simula el intestino grueso (fermentación colónica) y puede utilizarse en serie con el TIM1 o aisladamente ([https://www.tno.nl/media/4057/tim\\_gastrointestinal\\_systems.pdf](https://www.tno.nl/media/4057/tim_gastrointestinal_systems.pdf)). Otros sistemas imitan el tracto gastrointestinal completo hasta el compartimento colónico tal como el simulador del ecosistema microbiano intestinal, SHIME (Marzorati y col., 2010); o se centran en algunas partes: el estómago en el Simulador Gástrico Humano (HGS) (Kong y col., 2010) y en el Modelo gástrico Dinámico (DGM) (Wickham y col., 2012), o el intestino delgado (Tharakan y col., 2010). Sin embargo, estos sistemas, cuando están disponibles comercialmente, son caros y aún permanece la necesidad de sistemas dinámicos simples, fáciles de limpiar y manejar. En la Unité Biopolymères Interactions Assemblages (BIA) del INRA de Nantes (Francia) se ha diseñado un simulador dinámico de la digestión, el DIDGI® (**Esquema 1.1**). Este aparato comprende tres compartimentos (estómago e intestino delgado dividido en dos compartimentos separados) y una serie de bombas que aseguran el tránsito de los alimentos, la regulación del pH, la inyección de las enzimas digestivas y de la bilis en tiempo real. Todo es controlado por el software Storm® que puede registrar y almacenar diversos datos durante el proceso digestivo (volúmenes de alimentos, secreciones). El DIDGI® ha sido validado para la digestión de preparados para lactantes mediante la comparación de la cinética de proteólisis en el equipo con la obtenida en cerdos (Ménard y col., 2014), demostrando que, si se cuenta con parámetros fisiológicamente relevantes, el equipo simula correctamente el proceso digestivo. El DIDGI® es un sistema robusto utilizado actualmente por varios equipos del INRA para estudiar la digestión de matrices de alimentos tan diferentes como la leche (Sánchez-Rivera y col., 2015), queso, carne, frutas y verduras.



Esquema 1.1. Simulador dinámico de la digestión DIDGI®

### Bioinformática aplicada al estudio de péptidos bioactivos.

La bioinformática o estudios *in silico* se puede definir como "la aplicación de recursos computacionales a datos biológicos" (Holton y col., 2013). En este marco los métodos bioinformáticos de modelado de la estructura tridimensional de péptidos y proteínas así como también los métodos de validación de tales modelos (dinámicas moleculares en fase acuosa) juegan un rol muy importante tanto en la predicción de péptidos bioactivos en determinados sistemas como en el estudio de los mecanismos moleculares que fundamentan su acción (Jimsheena y Gowda, 2010; Weimann y col., 2009) y están siendo utilizados en la exploración de péptidos bioactivos obtenidos de diferentes fuentes proteicas (Holton y col., 2013). Actualmente, la simulación molecular puede describir de manera realista y con detalle a nivel atómico la estructura y dinámica de péptidos. Además de determinar la estructura nativa, estas herramientas informáticas deberían poder describir el mecanismo de plegamiento y la topografía del plegado, incluyendo conformaciones transitoriamente estables. Así, las simulaciones moleculares actuales funcionan relativamente bien para caracterizar conformaciones peptídicas estables y para estimar velocidades y energías libres de plegamiento, aunque presenta más inconvenientes en el caso de estados no plegados o desordenados (Georgoulia y Glykos, 2019).

La combinación de herramientas *in silico* con herramientas experimentales permite la optimización tanto de los recursos experimentales como del diseño de los pasos a seguir en la comprobación experimental de las hipótesis. Puede proporcionar información sobre que secuencia de proteínas debe investigarse para obtener péptidos bioactivos, o si un péptido podría presentar una cierta actividad y qué enzimas podrían funcionar mejor para liberar esas secuencias peptídicas (Udenigwe, 2014; Je y col., 2015), de acuerdo a como se plantee el diseño experimental. En este Capítulo se realizarán algunos ensayos *in silico* a fin de obtener algunas propiedades de péptidos derivados de la digestión gastrointestinal de proteínas de amaranto que luego puedan aportar

información para la interpretación de los resultados experimentales de determinación de diferentes actividades antioxidantes.

## OBJETIVOS

### Objetivo general

El objetivo de este Capítulo es obtener y caracterizar las muestras que serán utilizadas en el desarrollo de los ensayos *in vitro* de este trabajo.

### Objetivos específicos

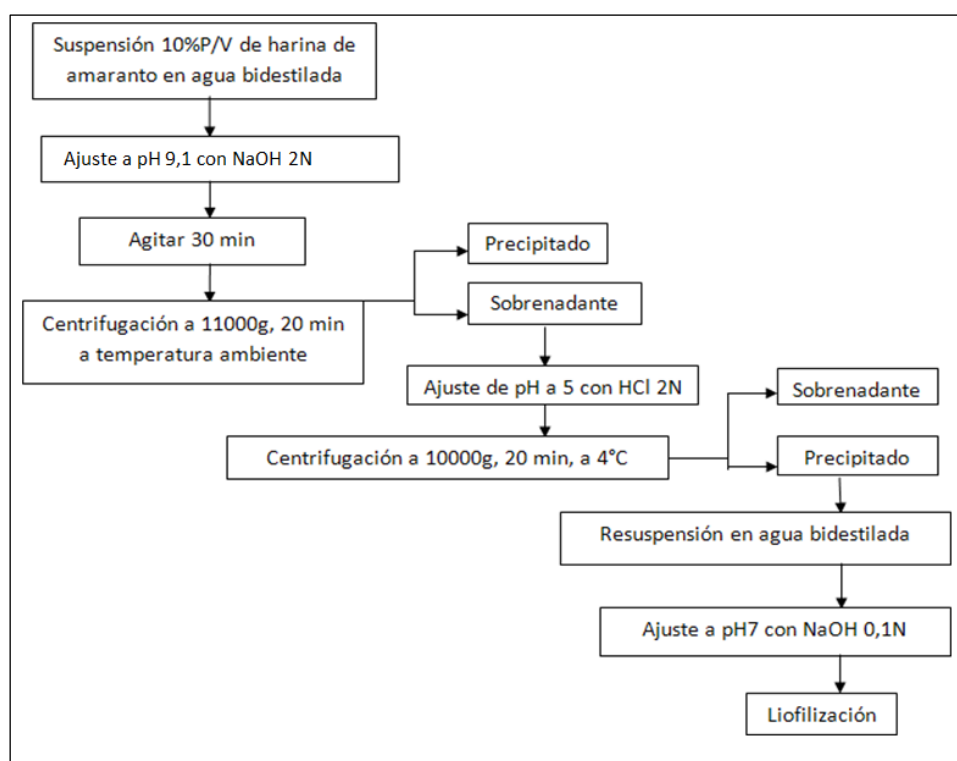
- Obtener digeridos a partir de simulación de la digestión gastrointestinal de proteínas de amaranto. Analizar el grado de hidrólisis, la composición molecular de los digeridos y su actividad frente a radicales libres en sistemas químicos acelulares. Evaluar la idoneidad del método de digestión gastrointestinal simulada utilizado en nuestro laboratorio por comparación con un método internacionalmente consensuado.
- Separar por métodos cromatográficos y caracterizar fracciones constituyentes de los digeridos, evaluando su actividad frente a radicales libres en sistemas químicos acelulares.
- Analizar propiedades fisicoquímicas y estructurales de péptidos con actividad frente a radicales peroxilo previamente identificados utilizando metodologías *in silico* y evaluar su actividad frente a radicales libres en sistemas químicos acelulares.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1.1. Preparación de aislado proteico de amaranto (A)

Se utilizaron semillas de *Amaranthus mantegazzianus* obtenidas a partir de cultivos llevados a cabo en Río Cuarto (cosecha 2013-2014). Las semillas se procesaron en un molino Udy con malla de 1 mm. La harina así obtenida se desgrasó mediante extracción con n-hexano para lo cual se preparó una suspensión de harina de 10 % p/v en el solvente y se la mantuvo en agitación durante 5 h a temperatura ambiente. Posteriormente se filtró y se secó por evaporación a temperatura ambiente.

Los aislados fueron preparados a partir de la harina desgrasada mediante una extracción a pH = 9, precipitación isoelectrica a pH = 5, neutralización y liofilización (Martínez y Añón, 1996), de acuerdo con el **Esquema 1.2**.



Esquema 1.2. Protocolo para la preparación de aislado proteico de amaranto.

### 1.2. Simulación de la digestión gastrointestinal

El aislado proteico de *Amaranthus mantegazzianus* fue sometido a digestión gastrointestinal simulada. Se llevaron a cabo tres protocolos de digestión simulada en sistemas estáticos:

#### 1.2.1. Protocolo 1 (Ad1): Método de nuestro laboratorio (Orsini Delgado y col., 2011)

Este método consta de una fase gástrica y una intestinal. *Fase gástrica*: Se preparó una suspensión de **A** en una solución de NaCl 0,03 M (2,5% p/v de proteína) y el pH se ajustó a 2 adicionando HCl 1,0 N. La solución se termostatóizó 30 min a 37 °C y luego se sometió a una hidrólisis con una solución de pepsina (pepsina de mucosa gástrica porcina 1:15000 MP Biomedicals, Inc.) en HCl 0,1 N y NaCl 0,03 M, en una relación pepsina/proteína 1/10 p/p, 1 h a 37

°C con agitación. *Fase intestinal*: Luego de neutralizar la solución a pH = 6 con NaOH se agregó una solución de pancreatina (Pancreatina Porcina 4X-USP MP Biomedicals, Inc.) en NaHCO<sub>3</sub> 0,1 N en una relación pancreatina/proteína 1/10 p/p, 1 h a 37 °C con agitación. Por último, se detuvo la actividad enzimática por calentamiento a 85 °C durante 10 min. Se preparó un sistema control (no hidrolizado, **Ac1**) sometiendo **A** a los mismos fluidos gástrico e intestinal en ausencia de enzimas. Las muestras fueron liofilizadas y almacenadas a 4 °C hasta su análisis.

**1.2.2. Protocolo 2 (Ad2): Modificación del método internacionalmente consensuado** (Minekus y col., 2014).

Se llevaron a cabo fases oral, gástrica e intestinal. *Fase oral*: Se preparó una suspensión de **A** (1 g) en 3,5 mL de solución de electrolitos correspondiente al fluido salival simulado (FSS, pH = 7) y se agregaron 0,5 mL de solución de  $\alpha$ -amilasa (26 mg/mL) en FSS, 25  $\mu$ L de solución de CaCl<sub>2</sub> 0,3 M y 975  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O (todas las soluciones preincubadas a 37 °C). Se agitó e incubó durante 2 min a 37 °C (Termomixer Eppendorf, 350 rpm). *Fase gástrica*: La suspensión oral fue mezclada con 7,5 mL de solución de electrolitos correspondiente al fluido gástrico simulado (FGS), 1,6 mL de solución de pepsina (pepsina de mucosa gástrica porcina 1:15000 5X NF standards, MP Biomedicals, 47,8 mg/mL) en FGS, relación pepsina/proteína = 1/10 p/p), 5  $\mu$ L de solución de CaCl<sub>2</sub> 0,3 M, ajustando el pH a 3 con HCl 2 N y agregando agua hasta completar los 10 mL de FGS. La mezcla fue incubada durante 2 h a 37 °C con agitación (Termomixer Eppendorf, 350 rpm). *Fase intestinal*: La mezcla gástrica fue mezclada con 11 mL de solución de electrolitos correspondientes al fluido intestinal simulado (FIS), 5,0 mL de solución de pancreatina (pancreatina porcina 4XUSP, MP Biomedicals, 15,3 mg/mL) en FIS, relación pancreatina/proteína 1/10 p/p), 2,5 mL solución de bilis bovina (150 mg/mL), y 40  $\mu$ L de CaCl<sub>2</sub> 0,3 M, el pH fue ajustado a 7 con NaOH 1 M y se agregó agua hasta completar los 20 mL de FIS. La mezcla fue incubada durante 2 h a 37 °C. Posteriormente, la actividad enzimática fue inactivada por calentamiento a 85 °C, 10 min. Las soluciones de electrolitos para FSS, FGS y FIS fueron preparadas según Minekus y col. (2014). Las relaciones pepsina/proteína y pancreatina/proteína fueron las mismas que las utilizadas en el protocolo 1. Se preparó un sistema control (no hidrolizado, **Ac2,3**) sometiendo **A** a los mismos fluidos oral, gástrico e intestinal en ausencia de enzimas, así como también un blanco de reactivos (sin muestra). Las muestras fueron liofilizadas y almacenadas a 4 °C hasta su análisis.

**1.2.3. Protocolo 3 (Ad3): Método internacionalmente consensuado** (Minekus y col., 2014).

Se llevaron a cabo fases oral, gástrica e intestinal de manera similar a la descrita en el punto anterior pero usando las actividades proteolíticas recomendadas por Minekus y col. (2014): solución de pepsina (pepsina P6887 (Sigma), 25000 Anson U/ml en FGS, 1,6 mL) y solución de pancreatina (pancreatina porcina P1750 4XUSP (Sigma), 800 TAME U/ml en FIS, 5 mL). El sistema control fue el mismo que en el protocolo anterior (**Ac2,3**). La actividad proteolítica de la pepsina (unidades Anson = una unidad produce un  $\Delta A_{280}$  de 0,001 por minuto a pH 2 y 37 °C, medido como productos solubles en TCA derivados de hemoglobina) y de la pancreatina

(unidades TAME = una unidad hidroliza 1  $\mu\text{mol}$  de éster metílico de p-tolueno-sulfonil-L-arginina (TAME) por minuto a 25 °C, pH 8.1) fueron determinadas según la metodología recomendada por Minekus y col. (2014).

### 1.3. Composición de las muestras

**1.3.1. Hidratos de carbono: Método colorimétrico de antrona** (Loewus, 1952). Las muestras fueron sometidas, antes del ensayo colorimétrico, a una hidrólisis ácida con HCl 12,0 M a ebullición durante 2 h a reflujo. Se preparó una curva de calibración con glucosa patrón (Sigma). Luego de la reacción con el reactivo de antrona (9(10H)-Anthracenone, Sigma) en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  98 % p/p, se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro Beckman DU 650 ( $\lambda = 620 \text{ nm}$ ).

**1.3.2. Proteína total: Método de microKjeldahl** (Nkonge y Balance, 1982). Muestras de los liofilizados (conteniendo aproximadamente 10 mg de proteínas) fueron digeridas por calentamiento en presencia de catalizador ( $\text{Na}_2\text{SO}_4/\text{CuSO}_4$  10/1 p/p) y  $\text{H}_2\text{SO}_4$  98 % p/p, hasta que la mezcla adquirió un color verde translúcido. La solución resultante se llevó a un volumen final de 50 mL con agua bidestilada para luego realizar la reacción colorimétrica. Para la curva de calibración se digirieron muestras de seroalbúmina bovina (Sigma) (0 y 6  $\mu\text{g}$  de nitrógeno/100  $\mu\text{L}$  de solución). El amoníaco producido fue determinado por desarrollo de una coloración azul verdosa debida a la formación de un complejo fenol-indofenol por reacción con soluciones de fenol alcalino, hipoclorito y nitroprusiato de sodio. Para la reacción colorimétrica 250  $\mu\text{L}$  de muestra se mezclaron con 750  $\mu\text{L}$  de solución A+B (50:50) (A:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,2 M, NaOH 0,2 M y tartrato de Na y K 0,36 M; B: NaOH 2,5 M), 200  $\mu\text{L}$  de solución N-S (Nitroprusiato-Salicilato) y 100  $\mu\text{L}$  de hipoclorito de sodio con 5,5 % de cloro activo. Se incubó durante 20 min a temperatura ambiente y luego a 350  $\mu\text{L}$  de esta mezcla de reacción se le adicionaron 975  $\mu\text{L}$  de agua bidestilada y se midió la absorbancia a 660 nm. Para calcular el contenido de proteínas se utilizó un factor de Kjeldhal  $f = 5,85 \text{ mg de proteína/mg de nitrógeno}$  (Becker y col, 1981).

**1.3.3. Agua: Método indirecto** (AOAC1984, 24.002). Una masa exactamente pesada de muestra fue colocada en una estufa a  $103 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  secándose hasta peso constante.

**1.3.4. Cenizas totales: incineración en mufla** (AOAC1984, 24.009). Se colocó una cantidad exactamente pesada de muestra y se calentó en mechero hasta residuo carbonoso, luego se colocó en la mufla a 550 °C hasta cenizas blancas y peso constante.

**1.3.5. Lípidos: Método de Soxhlet** (AOAC: 1990, 920.39). Se realizó una extracción semi-continua de los lípidos con éter de petróleo, determinando gravimétricamente el extracto lipídico. Se colocó una masa exactamente pesada de muestra liofilizada en un cartucho de extracción libre de grasa, el cual se ubicó en el tubo extractor de Soxhlet. Por la parte superior del mismo se agregó el solvente en una cantidad que excedía la necesaria para un sifonado. Se llevaron a cabo 7 ciclos de llenado y sifonado del tubo extractor a fin de asegurar la extracción completa de los lípidos. La masa de lípidos extraída en el balón fue determinada por pesada luego de la eliminación total del solvente.



#### 1.4. Determinación del grado de hidrólisis proteica

El grado de hidrólisis proteica se determinó mediante el método del ácido trinitrobencenosulfónico (TNBS) (Adler- Nissen, 1979) a través del cual se mide la concentración de grupos aminos libres. Para ello, dispersiones (aproximadamente 1 mg proteína/ml) en buffer fosfato 0,2125 M, SDS 1%, pH = 8,2 se incubaron a 75 °C durante 15 min. Se tomó un alícuota y se mezcló con el mismo buffer sin SDS y ácido 2,4,6 trinitrobencenosulfónico (Sigma) 0,025 %. La mezcla se incubó a 50 °C durante 60 min al abrigo de la luz. Se detuvo la reacción por agregado de HCl 0,1 N y se dejó enfriar. Se leyó la absorbancia a 340 nm en un espectrofotómetro Beckman DU 650. Se construyó una curva de calibración con concentraciones entre 0,225 y 2,25 mM de L-Leucina (ácido L-2-Amino-4-metilpentanoico, Sigma), a partir de una solución de 45 mM en agua destilada. Las diluciones para la curva se realizaron utilizando buffer fosfato 0,2125M, pH = 8,2 (el mismo que se usó para las muestras). Todas las medidas fueron realizadas por duplicado. El grado de hidrólisis se determinó a partir de la Ecuación 1.1:

$$GH = 100 \times ([-\text{NH}_2]_h - [-\text{NH}_2]_0) / ([-\text{NH}_2]_\infty - [-\text{NH}_2]_0) \quad \text{Ecuación 1.1}$$

Dónde:

$[-\text{NH}_2]_h$  Concentración de grupos amino libres en la muestra hidrolizada;

$[-\text{NH}_2]_0$ : Concentración de grupos amino libres en la muestra sin hidrolizar;

$[-\text{NH}_2]_\infty$ : Concentración de grupos amino libres en la muestra hidrolizada completamente, cuyo valor fue obtenido a partir de la Ecuación 1.2.

$$[-\text{NH}_2]_\infty = C_{\text{prot}} \times (1 + f_{\text{Lys}}) / M_{\text{aa}} \quad \text{Ecuación 1.2}$$

Dónde:  $M_{\text{aa}} = 130$  g/mol (promedio de pesos moleculares de los aminoácidos en las proteínas de amaranto);  $f_{\text{Lys}} = 1/15$  (proporción de lisina en las proteínas de amaranto, Bresani, 1994) y  $C_{\text{prot}}$  Concentración de proteínas en la muestra.

#### 1.5. Caracterización de la composición molecular por electroforesis

##### 1.5.1 Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970)

Las muestras liofilizadas fueron dispersadas en buffer muestra 1X (Tris 0,0625 M, SDS 2 %, Glicerol 10 %v/v), con y sin 2-mercaptoetanol (5% v/v). Las que contenían 2-mercaptoetanol fueron incubadas en un baño a 100 °C durante 3 min. Las corridas fueron llevadas a cabo en un equipo Mini-Protean II (BIO-RAD), utilizando geles separadores de poliacrilamida 12 % p/v y de apilamiento 4 % p/v. Se utilizaron patrones de bajo peso molecular (GE HealthCare): fosforilasa b (97 kDa), seroalbúmina bovina (66 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), anhidrasa carbónica (30 kDa), inhibidor de tripsina (20,1 kDa) y  $\alpha$ -lactoalbúmina (14,4 kDa). Los geles fueron corridos a corriente constante (30 mA por placa, voltaje máximo 200 V), a temperatura ambiente, hasta que el frente de corrida llegó al borde inferior del gel. Se realizó inicialmente una coloración con Coomassie Brilliant Blue R-250. En los casos necesarios, se realizó una tinción con plata para aumentar la sensibilidad de la detección (Blum y col. 1987).

### **1.5.2. Electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida con tricina (tricina-SDS-PAGE) (Schägger, 2006)**

La utilización de geles con tricina es muy adecuada para la separación de polipéptidos en el rango de 1 a 30 kDa y tiene la particularidad de usar dos buffers distintos: un buffer catódico conteniendo tricina y un buffer anódico de Tris-HCl. La tricina es utilizada como ión de arrastre en el buffer catódico, permitiendo una mayor resolución de proteínas pequeñas. Se empleó un sistema de tres geles de diferente concentración: un gel de apilamiento (stacking), un gel espaciador (spacer) y un gel separador que contienen 4, 10 y 16 % de acrilamida respectivamente. El gel separador también contenía urea (6 M). Las muestras liofilizadas fueron dispersadas en buffer muestra 1X (Tris-HCl 37,5 mM, glicerol 7,5 % p/v (Anedra), SDS 3 % p/v, Coomassie blue G 250 (Serva) 0,0125 % p/v, pH = 7), en ausencia y en presencia de 2-mercaptoetanol (5 % v/v). Las que contenían 2-mercaptoetanol se incubaron en baño a 100 °C durante 3 min. Se sembraron patrones de muy baja masa molecular (triosafosfato isomerasa (26625 Da), mioglobina (16950 Da),  $\alpha$ -lactoalbúmina (14437 Da), aprotinina (6512 Da), cadena b oxidada de insulina (3496 Da), bacitracin (1423 Da). Las electroforesis se realizaron en un equipo Mini Protean II (BIO-RAD), a voltaje constante, empezando con 30 mA durante el pasaje a través del gel stacking y aumentando a 100 mA para el resto de la corrida. Finalizada la corrida, se trataron los geles con solución fijadora (metanol 50 %, ácido acético 10 %, acetato de amonio 100 mM) durante 45 min y luego se realizó la coloración con solución de Coomassie Brilliant Blue R-250. En los casos necesarios, se realizó una tinción con plata para aumentar la sensibilidad (Blum y col. 1987).

### **1.6 Obtención y cuantificación de fracciones solubles.**

Se prepararon dispersiones de las muestras liofilizadas (10 mg/mL) en buffer fosfato 35 mM (pH = 7,8) agitando a 37 °C y 300 rpm durante 60 min en un equipo Termomixer Eppendorf. Luego se centrifugaron las muestras a temperatura ambiente durante 10 min a 10400 x g en una microcentrífuga a temperatura ambiente (Spectrafuge 24D, LabNet International) y se separó el sobrenadante. La determinación de la concentración proteica en las fracciones solubles se realizó mediante el método de Lowry (Lowry y col., 1951). Para ello, diluciones de las fracciones solubles en buffer fosfato 35 mM (pH = 7,8) se mezclaron con solución A+B (A: Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2 % p/v - NaOH 0,1 N; y B: CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 1 % p/v, tartrato de sodio y potasio 2 % p/v), se agitaron vigorosamente con un vórtex y se dejaron reposar durante 10 min a temperatura ambiente, momento en el cual se les agregó la solución de Folin (dilución 50 % v/v en agua bidestilada) (Folin Ciocalteu, Anedra), se agitaron enérgicamente y se dejaron reposar durante 30 min a temperatura ambiente. Se midió la absorbancia a 750 nm en un espectrofotómetro Beckman DU 650. Se realizó una curva de calibración con albúmina de suero bovino (Sigma) (0 - 0,4 mg/mL).

Se calculó la *solubilidad proteica* como:

$$S\% = s \times 100 / \text{Proteína total}$$

*Ecuación 1.3*

s: contenido de proteína en el sobrenadante determinado por Lowry.

Proteína total: contenido total de proteína en la masa inicial según determinación por MicroKjeldahl ( $f = 5,85$ )

### 1.7. Caracterización molecular y separación de las fracciones solubles mediante cromatografía de filtración molecular FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography).

En este tipo de cromatografía, la fase estacionaria se encuentra constituida por partículas poliméricas de diferente porosidad. El principio básico de separación está relacionado con el tamaño de las partículas; las proteínas más grandes no podrán ingresar en los poros de la matriz de filtración y, por lo tanto, serán eluidas con mayor rapidez que aquellas proteínas pequeñas que van penetrando en los distintos poros de las partículas y siguen un camino más tortuoso y largo. El tamaño de los poros internos generados dependerá de la naturaleza del polímero que forme la fase estacionaria y permitirá la separación de proteínas por debajo de una determinada masa molecular (Madadlou y col., 2010). En este caso se utilizaron columnas Superdex 30 (GE Healthcare) compuestas por una matriz de dextrano unido covalentemente con agarosa altamente sustituida. Dicha matriz combina las excelentes propiedades de filtración en gel del dextrano con la estabilidad física y química de la agarosa con un elevado número de sustituciones, y posee un límite de exclusión de 10 kDa y un rango de separación óptimo para moléculas entre 0,1 y 7 kDa.

#### 1.7.1. Columna analítica

Se analizaron las fracciones solubles en buffer fosfato 35 mM ( $\text{pH} = 7,8$ ) de todas las muestras usando una columna Superdex Peptide 10/300 (GE Healthcare). El volumen total ( $V_t$ ) de la columna es de 24 mL. Las corridas cromatográficas se realizaron en un equipo AKTA Purifier **ver si tiene algún modelo**(GE Healthcare Bioscience AB) a temperatura ambiente inyectando 0,5 mL de muestra; como fase móvil se usó buffer fosfato 35 mM,  $\text{pH} = 7,8$  a un flujo de 0,5 mL/min. Los polipéptidos y péptidos fueron detectados midiendo la absorbancia a 210 nm. La calibración se realizó usando azul dextrano para determinar el volumen de exclusión ( $V_0 = 7,6$  mL), aprotinina (6,5 kDa), vitamina B12 (1,85 kDa), ácido hipúrico (0.179 kDa), obteniendo la siguiente expresión para la determinación de la masa molecular (MM):  $\log MM = 4.84 - 3.30 \times K_{av}$  ( $r^2=0.9398$ ), donde  $K_{av} = (V_e - V_0) / (V_t - V_0)$ ,  $V_e$  = volumen de elución.

*Separación de fracciones.* Se colectaron fracciones cada 0,5 mL. La concentración proteica en las fracciones se determinó mediante el método de Lowry (Lowry y col., 1951) o, en los casos en los que se requería mayor sensibilidad, mediante el método de Lowry modificado por Stoscheck (1990). Para esta determinación se preparó el reactivo de Lowry modificado mezclando 3 volúmenes del reactivo de cobre ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  6,66 % p/v,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0,13% p/v, tartrato de Na y K 0,066 % p/v) con un volumen de SDS 1 % p/v y un volumen de NaOH 1 M. Se tomaron 100  $\mu\text{L}$  de muestras y se mezclaron con 100  $\mu\text{L}$  del reactivo de Lowry modificado recién preparado, se agitó vigorosamente y se dejó reposar durante 10 min a temperatura ambiente, momento en el cual se agregaron 50  $\mu\text{L}$  de Folin (previamente diluido 1/10 en agua MiliQ) (Folin Ciocalteu, Anedra), se agitó enérgicamente y se dejó reposar durante 30 min a temperatura ambiente. Se midió la

absorbancia a 750 nm en un lector de microplacas (SYNERGY HT – SIAFRT, Biotek Instruments, Vermont, Estados Unidos). Paralelamente se realizó una curva de calibración con albúmina de suero bovino (Sigma) (0-0,2 mg/mL).

### 1.7.2. Columna semi-preparativa

Se analizó la fracción soluble en buffer fosfato 35 mM (pH = 7,8) de **Ad1** en una columna armada en nuestro laboratorio con una matriz Superdex 30 (GE Healthcare) de grado preparativo. La columna presenta un volumen total ( $V_t$ ) de 110 mL. Las corridas cromatográficas se realizaron en un equipo AKTA Purifier (GE Healthcare Bioscience AB) a temperatura ambiente inyectando 2 mL de muestra; como fase móvil se usó buffer fosfato 35 mM, pH = 7,8 a un flujo de 0,8 mL/min. Los polipéptidos y péptidos fueron detectados midiendo la absorbancia a 210 nm. La calibración se realizó usando azul dextrano para determinar el volumen de exclusión ( $V_0 = 38,9$  mL), insulina humana (5,8 kDa), péptido LAGKPQQEHSGEHQ (1,54 kDa), péptido GDRFQDQHQ (1,13 kDa), N-Hippuryl-His-Leu (0,43 kDa) y tirosina (0,18 kDa), obteniendo la siguiente expresión para la determinación de la masa molecular (MM):  $\log MM = 1.20 - 2.31 \times K_{av}$  ( $r^2 = 0.9874$ ), donde  $K_{av} = (V_e - V_0) / (V_t - V_0)$ ,  $V_e$  = volumen de elución.

*Separación de fracciones.* Se separaron fracciones de **Ad1** cada 1,6 mL. La concentración proteica de las fracciones se determinó mediante el método de Lowry (Lowry y col., 1951).

## 1.8. Caracterización de péptidos derivados de digerido gastrointestinal de aislado de amaranto.

En trabajos previos llevados a cabo en nuestro laboratorio se logró en la identificación de péptidos generados por la digestión gastrointestinal simulada de aislado proteico de amaranto (**Ad1**) con potencial actividad antioxidante. La metodología de obtención de dichos péptidos por nuestro grupo de trabajo fue la siguiente (Orsini Delgado y col., 2016):

1. A partir de la fracción soluble de **Ad1**, se realizó una separación de fracciones por RP-HPLC utilizando una columna preparativa SunFire C8 ST 10/250 (Waters) en un sistema de HPLC Waters (Waters Corp., Milford, MA) equipado con un detector de arreglo de diodo (DAD). Se utilizó una elución en gradiente utilizando dos solventes: el solvente A fue una mezcla de agua y acetonitrilo (98:2) con ácido trifluoroacético TFA (650  $\mu$ L/L) y el solvente B fue una mezcla de agua y acetonitrilo (35:65) con TFA (650  $\mu$ L/L). Las muestras filtradas (0,45  $\mu$ m) se eluyeron con un gradiente lineal de disolvente B en A (0 a 100% en 55 min, velocidad de flujo: 5,2 mL / min). La separación se llevó a cabo a 40 °C. La detección se realizó a 210 y 280 nm. Las fracciones (0,6 min) se recogieron, agruparon y liofilizaron.
2. Las fracciones liofilizadas fueron solubilizadas en 100  $\mu$ L de buffer fosfato 35 mM, (pH = 7,8) y la capacidad antioxidante de las mismas fue evaluada a través del método de ORAC.
3. Ciertas fracciones obtenidas por RP-HPLC y que presentaron una elevada actividad ORAC, fueron analizadas por espectrometría de masas en el laboratorio “Biopolymers - Structural Biology” perteneciente al INRA (Instituto Nacional de Investigación Agronómica), centro Angers-Nantes,

Francia. Las muestras liofilizadas fueron solubilizadas en 30 µL del solvente A (0,1 % de ácido fórmico en agua), diluidas y analizadas por cromatografía líquida de nanoflujo – espectrometría de masas/espectrometría de masas (nanoLC-MS/MS) acoplado a un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap VELOS (Thermo-Fisher). La separación cromatográfica se llevó a cabo con una columna capilar de fase reversa de 15 cm (Acclaim Pepmap C18 2-µm 100 Å, 75-µm i.d.) aplicando un gradiente de 4 a 50 % del solvente B (90% de acetonitrilo 0,08% de ácido fórmico) en el solvente A en 28 minutos, con un flujo de 300 nL/min. Para el análisis de la fragmentación de los péptidos (MS/MS) se adquirieron los scaneos MS totales a una resolución de 30,000 (FWMH) usando el analizador Orbitrap (rango m/z: 300- 2000) así como los espectros (MS/MS) de disociación inducida por colisión (CID) para los cinco iones más intensos en la trampa LTQ. Una vez obtenidos los datos, éstos fueron analizados con el software MASCOT 2.2 (Matrix Science) contrastando con la base Uniprot (Universal Protein Resource) restringida a la taxonomía *Amaranthus* (junio 2013). Los parámetros utilizados para las búsquedas en la base de datos incluyen: oxidación variable de metioninas y tolerancia de los iones a 5 ppm para los padres y 0,5 Da para los fragmentos. Las proteínas se consideraron válidas cuando se combinaron con un único péptido con una puntuación individual superior al umbral calculado por Mascot (para un valor de  $p < 0,05$ ).

4. Conocidas las secuencias de los péptidos detectados en cada fracción, se seleccionaron secuencias con potencial actividad ORAC a través del análisis de relaciones estructura/actividad y haciendo uso de modelos teóricos (modelos QSAR) para este tipo de actividad. Los péptidos seleccionados fueron sintetizados por Zhejiang Ontores Biotechnologies Co., Ltd (China), con una pureza mayor al 95 % p/p obtenida por un análisis por RP-HPLC (fase móvil: A: 0,1% de TFA en agua, B: 0,1% de TFA en 80% de ACN; gradiente: 17% - 37% de B en 20 minutos; flujo: 1,0 ml/min, columna: Agilent ZORBAX 3005SB-C18 4.6/250mm) y su identidad fue confirmada por espectrometría de masas. Se sintetizaron 10 secuencias peptídicas derivadas de la globulina 11S.

5. Los péptidos sintetizados y liofilizados fueron solubilizados en buffer fosfato 35 mM (pH = 7,8) y se evaluó su actividad por el método de ORAC, obteniéndose curvas dosis-respuesta y, a partir de ellas, el valor de la concentración de proteínas necesarias para lograr una inhibición del 50 % ( $IC_{50}$ ).

A partir de los resultados obtenidos (Orsini Delgado y col., 2016), se decidió en el presente trabajo profundizar el análisis de propiedades fisicoquímicas y estructurales de los péptidos, así como el estudio de la actividad antioxidante a través de otras metodologías. A fin de caracterizar los péptidos, se realizaron diversos estudios *in silico* con la colaboración de la Dra Agustina Nardo, integrante de nuestro laboratorio y especializada en bioinformática.

#### **1.8.1. Análisis *in silico* de propiedades fisicoquímicas de los péptidos**

A partir de las secuencias peptídicas y haciendo uso del servidor Sequence Manipulation Suite (<http://www.bioinformatics.org/sms2/index.html>) (Stothard, 2000) se obtuvieron propiedades fisicoquímicas tales como *punto isoeléctrico*, *carga neta*, *proporción de distintos tipos de*

*aminoácidos, relación Hidrofobicidad/hidrofiliidad* (mediante el parámetro GRAVY, de sus siglas en inglés *grand average of hydropathy*). El valor GRAVY es calculado sumando el valor de hidropatía de cada residuo y dividiendo por la longitud de la secuencia (Kyte y Doolittle, 1982).

### **1.8.2. Análisis in silico de la estructura de los péptidos y propiedades derivadas.**

Las estructuras de los péptidos fueron obtenidas a partir de 5 nanosegundos de simulación de dinámica molecular. Se utilizó el software MOE2015.1 para configurar los sistemas de simulación (Molecular Operating Environment Version 2015.1. Chemical Computing Group, [http://www.chemcomp.com/MOEMolecular\\_Operating\\_Environment.htm](http://www.chemcomp.com/MOEMolecular_Operating_Environment.htm)). Se utilizó la herramienta de creación de MOE para generar las estructuras 3D de los cada péptido. La estructura de la proteína se protonó utilizando el campo de fuerza AMBER12 y se minimizó con un gradiente de RMS de 0,05 kcal/mol. Se generaron 100 picosegundos de equilibración de la estructura en fase acuosa con Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> como contraiones a 300 °K seguidos de 4900 picosegundos de simulación a temperatura constante, empleando un cubo de solvatación de margen 6, con condiciones periódicas de contorno en Campo de fuerzas AMBER12:EHT. Las trayectorias obtenidas fueron analizadas graficando la evolución de energía total (U), RMSD (*root-mean-square deviation*), RMSF (*root-mean-square fluctuation*) y otros. En “otros” análisis se incluyen las observaciones necesarias para detectar y caracterizar las propiedades (superficies accesibles, etc).

A partir de las conformaciones de los péptidos a las que se arribó, se obtuvieron algunos descriptores a través del paquete QuaSAR del software MOE2015.1. Los métodos QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationships) asumen que la actividad biológica está correlacionada con propiedades o estructuras químicas y como consecuencia la actividad puede ser modelada como una función de atributos fisicoquímicos calculables (descriptores). El paquete MOE QuaSAR puede calcular una gran variedad de descriptores que pueden ser categorizados en (<https://www.chemcomp.com/journal/qsar.htm>):

- Descriptores 2D: son calculados a partir de propiedades atómicas y de conectividad. Algunos ejemplos son: masa molecular, ramificaciones moleculares, polarizabilidades atómicas.

- Descriptores i(interno)3D: usan coordenadas atómicas 3D relativas Algunos ejemplos son: energía potencial, volumen, superficies accesibles.

- Descriptores x(externo)3D: usan coordenadas atómicas 3D absolutas (se requieren moléculas alineadas); por ejemplo: coordenada del momento dipolar, energía de interacción con un receptor.

En este caso, se obtuvieron descriptores i3D tales como *volumen* y *área superficial accesible al solvente*.

### **1.8.3. Análisis in silico de propiedades relacionadas con la interacción péptido-célula**

- *Toxicidad*: se predijo la toxicidad de las secuencias peptídicas a través del servidor ToxinPred (<http://crdd.osdd.net/raghava/toxinpred/index.html>), el cual está diseñado para predecir y diseñar péptidos tóxicos o no tóxicos en base a un banco de datos de 1805 péptidos tóxicos ( $\leq 35$  residuos) (Gupta y col., 2013).

- *Penetración celular de los péptidos*: Se predijo la probabilidad de los péptidos de penetrar una célula a través del servidor CPPred (<http://distilldeep.ucd.ie/CPPpred>). CPPred es un servidor para la predicción de péptidos capaces de penetrar células basado en una red neuronal. Al proveerle un set de péptidos (con longitudes de entre 5 y 30 residuos) estima cuán probable es que cada uno de ellos pueda penetrar células, ranqueándolos con un score (entre 0 y 1) (Holton y col., 2013).

## 1.9. Actividad frente a radicales libres en sistemas *in vitro* químicos

Se evaluó la actividad frente a radicales libres de las distintas muestras a través de dos metodologías:

### 1.9.1. Ensayo ORAC (Oxygen Radical Absorption Capacity)

A través de este método es posible medir la capacidad secuestrante de radicales libres al exponer la muestra a un generador de radicales peroxilos (2,2' Azo bis-(2-metilpropionamida) dihidrocloruro, AAPH) a 37 °C, utilizando la fluoresceína (3',6'-dihidroxispirol [isobenzofuran-1(3H),9'[9H]-xanten]-3-ona) como sonda fluorescente. Lo que se determina es la degradación oxidativa de la fluoresceína, que al reaccionar con los radicales generados por el AAPH se descompone formando diversas estructuras con la consiguiente pérdida de fluorescencia (Ou y col., 2001). Se preparó una solución stock de fluoresceína en buffer fosfato 35 mM (pH = 7,8) y se mantuvo en la oscuridad a -80 °C. En el momento del ensayo, la misma se diluyó hasta una concentración de 53,3 nM y se preparó una solución 160 mM de AAPH en el mismo buffer. Se mezclaron 150 µL de la solución de fluoresceína con 25 µL de muestra, buffer fosfato (control negativo) o Trolox (concentraciones entre 6,25 y 75 µM) y 25 µL de AAPH, en placas negras de 96 pocillos. Las placas se incubaron a 37 °C con agitación continua y se realizaron lecturas de fluorescencia ( $\lambda_{exc}$ : 485 nm,  $\lambda_{em}$ : 535 nm) cada 1 min durante 45 min en un lector de microplacas (SYNERGY HT – SIAFRT, Biotek Instruments, Vermont, Estados Unidos). Se calculó el área bajo la curva (AUC) a partir de la *Ecuación 1.4* donde  $f_i$  es la fluorescencia en un tiempo determinado y  $f_0$  la fluorescencia inicial. Paralelamente se realizó un blanco sin la adición de la solución de AAPH, y el porcentaje de secuestro de radicales peroxilo fue calculado a través de la *Ecuación 1.5* donde M se refiere a la muestra, B al blanco y CN al control negativo en el cual se adicionó buffer en lugar de la muestra.

$$AUC = 0,5 + f_1/f_0 + f_2/f_0 + \dots + f_{i-1}/f_0 + 0,5 f_i/f_0 \quad \text{Ecuación 1.4}$$

$$\% \text{ de Secuestro de ROO}^\bullet = [(AUC_M - AUC_{CN}) / (AUC_B - AUC_{CN})] \times 100 \quad \text{Ecuación 1.5}$$

Una vez obtenidos los valores correspondientes de secuestro de radicales peroxilo, en algunos casos se obtuvieron curvas dosis-respuesta graficando estos valores en función de la concentración proteica en la muestra. Estas curvas fueron ajustadas según un modelo no lineal dosis-respuesta sigmoidal (pendiente variable):

$$Y = B + \frac{T - B}{1 + 10^{(x_{50} - x)P}}$$

Donde: B = mínimo, T = máximo, Y = % inhibición del radical, X = log concentración,  $X_{50} = IC_{50}$ , P = pendiente Hill (GraphPad Prism version 5.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego, California, USA). Para normalizar las curvas, el mínimo fue establecido como 0 y el máximo como 100 %. Se obtuvo el parámetro  $IC_{50}$  que corresponde a la concentración de proteína que es capaz de lograr un 50 % de neutralización de los radicales (Orsini Delgado y col., 2015).

### 1.9.2. Ensayo HORAC (Hydroxyl Radical Averting Capacity)

A través de este método es posible medir la capacidad de inhibición de radicales hidroxilo ( $OH^\bullet$ ) al exponer la muestra a un sistema generador de estos radicales,  $H_2O_2/M^{+2}$ , a través de la reacción de Fenton a 37 °C, utilizando la fluoresceína como sonda fluorescente. De la misma manera que ocurre en el método ORAC, lo que se determina en este ensayo es la degradación oxidativa de la fluoresceína pero en este caso por reacción con los radicales hidroxilo generados con la consiguiente pérdida de fluorescencia (Ou y col., 2002). Aquellos compuestos con capacidad antioxidante protegerán a dicha molécula de la degradación oxidativa, inhibiendo o disminuyendo la pérdida de fluorescencia. Este método fue adaptado previamente en nuestro laboratorio a partir de Ou y col. (2002) y Moore y col. (2006) (Orsini Delgado y col., 2015). Se preparó una solución de fluoresceína 0,0603  $\mu M$  en buffer fosfato 35 mM (pH = 7,8); una solución de  $H_2O_2$  0,75 M en agua Milli-Q y una solución de  $Co^{+2}$  (10 mg de ácido picolínico y 11 mg de  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$  en 50 mL de agua Milli-Q). Para llevar a cabo la reacción se mezclaron en placas negras de 96 pocillos (Greiner Bio-One): 20  $\mu L$  de las muestras o del buffer (control negativo) con 190  $\mu L$  de la solución de fluoresceína, 15  $\mu L$  de  $H_2O_2$  y 75  $\mu L$  de la solución de  $Co^{+2}$ . Se procedió a la agitación de la placa y a su incubación durante 3 h en un lector de microplacas (SYNERGY HT-SIAFRT, Biotek), realizando medidas de fluorescencia ( $\lambda_{exc} = 485$  nm,  $\lambda_{em} = 535$  nm) cada 1 min, para obtener la curva de decaimiento de la fluorescencia y calcular la correspondiente área bajo la curva (AUC) a partir de la *Ecuación 1.4*, donde  $f_i$  es la fluorescencia en un tiempo determinado y  $f_0$  la fluorescencia inicial. Paralelamente se realizó un blanco sin la adición del sistema  $Co^{+2}/H_2O_2$ , y el porcentaje de inhibición de radicales  $OH^\bullet$  fue calculado a través de la *Ecuación 1.6* donde M se refiere a la muestra, B al blanco y CN al control negativo en el cual se adicionó buffer en lugar de la muestra.

$$\% \text{ de Inhibición de } OH^\bullet = [(AUC_M - AUC_{CN}) / (AUC_B - AUC_{CN})] \times 100 \quad \text{Ecuación 1.6}$$

Nuevamente se realizó un ajuste no lineal sigmoideal de las curvas dosis-respuesta graficando el valor de inhibición de radicales  $OH^\bullet$  en función de la concentración proteica en la muestra, se obtuvo el parámetro  $IC_{50}$  que corresponde a la concentración de proteína que es capaz de lograr un 50 % de neutralización de los radicales (Orsini Delgado y col., 2015).



#### **1.10. Análisis estadístico.**

Los datos correspondientes al grado de hidrólisis, solubilidad proteica y actividad antioxidante fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANAVA). Cuando las diferencias fueron significativas ( $p < 0,05$ ), los valores medios fueron evaluados mediante Diferencias Cuadradas Medias (LSD) usando el test de Tukey (Graph Pad Prism 5.0, USA).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1.A. COMPARACIÓN DE MÉTODOS DE DIGESTIÓN GASTROINTESTINAL SIMULADA

#### 1.A.1 Caracterización de los digeridos gastrointestinales

Anteriormente, en nuestro laboratorio se desarrolló un método estático simplificado de digestión gastrointestinal para ser aplicado a aislado proteico de amaranto, el cual está focalizado en la digestión proteica y consta solo de fases gástrica e intestinal utilizando soluciones de electrolitos muy sencillas (Orsini Delgado y col., 2011). Se demostró que el digerido obtenido de esta manera (llamado aquí **Ad1**) tiene la capacidad de actuar sobre distintas especies reactivas, especialmente frente a radicales peroxilos e hidroxilos y frente al anión peroxinitrito (Orsini Delgado y col., 2015).

Tabla 1.1. Condiciones de los tres protocolos de digestión gastrointestinal simulada

Muestra	Fase oral			Fase gástrica			Fase intestinal		
	Amilasa (U)	tiempo	fluido	Pepsina (AU/g proteína)	tiempo	fluido	Pancreatina (USP/g proteína)	tiempo	fluido
<b>A</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Ac1</b>	-	-	-	-	1 h	FGS1	-	1 h	FIS1
<b>Ac2,3</b>	-	-	FSS2	-	2 h	FGS2	-	2 h	FIS2
<b>Ad1</b>	-	-	-	385*	1 h	FGS1	9600	1 h	FIS1
<b>Ad2</b>	746,2	2 min	FSS2	385*	2 h	FGS2	9600	2 h	FIS2
<b>Ad3</b>	746,2	2 min	FSS2	51108	2 h	FGS2	18300	2 h	FIS2

AU = Unidades Anson según Minekus y col, 2014. \* 1 Unidad Anson = 0,8 USP

USP = Unidades de la Farmacopea de USA, 1 Unidad TAME = 19.2 USP (Minekus y col., 2014).

Composición de los fluidos (mM):

	Orsini Delgado y col, 2011		Minekus y col., 2014		
	FGS1	FIS1	FSS2	FGS2	FIS2
KCl <sup>4</sup>	--	--	15,1	6,9	6,8
KH PO <sup>3</sup>	--	--	3,7	0,9	0,8
NaHCO	--	100	13,6	25	85
NaCl <sup>6</sup>	30	--	--	47,2	38,4
MgCl (H O)	--	--	0,15	0,1	0,33
NH HCO *	--	--	0,07	0,6	--
CaCl <sub>2</sub>	--	--	1,5	0,15	0,6
pH	2	6	7	3	7

Dado que en el presente trabajo se propone continuar profundizando el estudio de la actividad antioxidante de este digerido, fue de nuestro interés comparar las características y propiedades del mismo con el de un digerido obtenido mediante un método estático estandarizado de digestión gastrointestinal, el cual ha sido consensuado internacionalmente en una importante red de investigadores que trabajan en esta temática (COST INFOGEST network). Para ello, se decidió realizar una digestión utilizando el protocolo estandarizado original (Minekus y col., 2014) obteniéndose **Ad3**, y también se llevó a cabo una versión modificada del mismo en la que se utilizaron las mismas relaciones enzima/sustrato que en el protocolo de nuestro laboratorio pero el

resto de las condiciones de digestión fueron las recomendadas por Minekus y col. (2014) obteniéndose **Ad2**. En la **Tabla 1.1** pueden observarse las principales condiciones de digestión para cada protocolo. Entre las diferencias más importantes entre el protocolo de nuestro laboratorio y el de consenso pueden mencionarse: la existencia de una fase oral en el último, diferencias en el pH y composición de electrolitos de los fluidos gástrico e intestinal, una menor actividad enzimática y tiempo de incubación en nuestro protocolo tanto en la fase gástrica como en la intestinal.

La **Tabla 1.2** muestra algunas propiedades de los tres digeridos obtenidos. El grado de hidrólisis proteica medido mediante el método del TNBS, es decir el % de enlaces peptídicos hidrolizados, no presentó diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los tres digeridos.

*Tabla 1.2. Propiedades de los sistemas preparados con diferentes protocolos de digestión*

Muestra	Proteólisis GH %	Proteína total (g/100 g muestra)	Proteína soluble (g/100 g proteína total)
<b>A</b>	-	78,40 ± 0,05	70 ± 3 <sup>a</sup>
<b>Ac1</b>	-	66,7 ± 0,4	43 ± 2 <sup>b</sup>
<b>Ac2,3</b>	-	48 ± 3	50 ± 4 <sup>b</sup>
<b>Ad1</b>	63 ± 6 <sup>a</sup>	67 ± 2	61 ± 3 <sup>a,b</sup>
<b>Ad2</b>	60 ± 4 <sup>a</sup>	55 ± 1	69 ± 2 <sup>a</sup>
<b>Ad3</b>	55 ± 3 <sup>a</sup>	53 ± 2	73 ± 5 <sup>a</sup>

*Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ )*

No hay demasiados trabajos en la literatura en los que se evalúe el efecto de las condiciones de digestión sobre el grado de hidrólisis proteico. Vermeirssen y col. (2003) compararon tres protocolos de digestión *in vitro* aplicados a proteínas de arvejas y de suero lácteo: una digestión “no óptima” (pH no óptimo en las fase gástrica (pH = 4) e intestinal (pH = 5), tiempos de incubación cortos: 30 min para cada fase), una digestión “fisiológica” (pH = 2 en la fase estomacal, pH = 6,5 en la fase intestinal, tiempos de incubación 2 y 2,5 h), y una digestión “óptima prolongada” (pH igual que en el caso anterior, tiempos de incubación: 4 y 4,5 h respectivamente), registrando un aumento en el grado de hidrólisis proteico cuando el pH fue óptimo para las actividades enzimáticas y cuando se aumentó el tiempo de incubación. Sin embargo, el efecto de estos cambios de condiciones fue diferente para cada tipo de proteína; por ejemplo, el aumento en el tiempo de digestión tuvo menor efecto en el caso de las proteínas de arvejas. Cabe remarcar además, que en este estudio, los fluidos gástrico e intestinal no incluían los electrolitos fisiológicos y que se utilizaron proteasas individuales (tripsina y quimotripsina) en lugar de pancreatina en la fase intestinal. En nuestro caso, diferencias en las condiciones de digestión tales como presencia de la fase oral, cambios en el pH de la fase gástrica (2 versus 3) y de la fase intestinal (6 versus 7), cambios cuali-cuantitativos en la composición salina de los fluidos gástrico e intestinal, y un cambio en el tiempo de incubación de cada fase (**Ad1** versus **Ad2**) no originaron una modificación apreciable en el contenido de grupos amino libres. Tampoco un aumento en las actividades

enzimáticas manteniendo el resto de las condiciones constantes (**Ad2** versus **Ad3**) se vio reflejado en un cambio en el grado de hidrólisis proteica. Estos resultados sugieren que en todos los protocolos se logró el máximo nivel de hidrólisis posible (bajo las condiciones de reacción utilizadas), ya que aumentos muy importantes en las actividades enzimáticas no lograron aumentar la proporción de enlaces hidrolizados.

En la **Tabla 1.2** se muestran también el contenido de proteína total en las muestras liofilizadas así como la solubilidad proteica en buffer fosfato 35 mM (pH = 7,8). El sistema control para el método 1 (**Ac1**) (muestra tratada con los correspondientes fluidos gástrico e intestinal sin enzimas) mostró una pérdida significativa ( $p < 0,05$ ) de solubilidad proteica respecto a **A**, esto podría ser atribuido a agregación por tratamiento a pH cercano al punto isoeléctrico de las proteínas de amaranto (durante la fase intestinal el pH es 6 mientras que el pH isoeléctrico es cercano a 5) como ha sido previamente informado (Orsini Delgado y col., 2011). También la incubación en presencia de los fluidos gastrointestinales correspondientes a los métodos 2 y 3 (**Ac2,3**) produjo una disminución significativa de solubilidad proteica ( $p < 0,05$ ) (**Tabla 1.2**), aunque en este caso el pH de la fase intestinal estaba más alejado del punto isoeléctrico pero se encuentran en el medio una mayor concentración de sales. De acuerdo con las características de las distintas fracciones proteicas de amaranto (descritas en la Introducción General), ni las albúminas ni las globulinas presentan una disminución de solubilidad por efecto del aumento en la concentración de iones. Sin embargo, se ha demostrado que la fracción globulina-p presenta una baja solubilidad a pH cercano a la neutralidad y que la insolubilización aumenta a medida que aumenta la concentración de NaCl por encima de 0,1 M (efecto salting out), probablemente debido a que se favorecen interacciones hidrofóbicas (Castellani y col., 1998). Por la tanto, es posible que esta sea la fracción más afectada en su solubilidad cuando se trata a **A** con los fluidos gastrointestinales, especialmente en la etapa intestinal donde se combina un pH neutro con una fuerza iónica por encima de 0,1. La digestión enzimática produjo un aumento significativo ( $p < 0,05$ , alrededor de un 40 %) en la solubilidad proteica de los tres digeridos (**Ad1**, **Ad2** y **Ad3**) respecto a sus correspondientes sistemas control, alcanzando valores similares a los de **A**. Es importante tener en cuenta que la determinación de la proteína soluble fue realizada por el método de Lowry, por lo que la presencia de moléculas muy pequeñas (dipéptidos, aminoácidos libres) sin grupos aromáticos en los digeridos podría estar subvalorada.

La composición polipeptídica/peptídica de los digeridos fue analizada mediante SDS-PAGE en comparación con las muestras no hidrolizadas. En la **Figura 1.1.A** se presenta un gel SDS-PAGE (en ausencia de 2-ME) en el que puede observarse un perfil típico para un aislado proteico de amaranto, con bandas de alta masa molecular (mayores a 66 kDa, 53 y 57 kDa) que pueden ser atribuidas principalmente a polipéptidos constituyentes de las fracciones globulinas y/o globulina-p; polipéptidos de masas intermedias (45, 38 y 32 kDa) y de baja masa molecular ( $\leq 20$  kDa) relacionados con las globulinas y albuminas (Martínez y Añón, 1996). También pueden observarse moléculas de alta masa molecular que no ingresan al gel (**Figura 1.1.A, calle 1**). En presencia de

2-ME, las bandas de mayores masas desaparecen casi completamente y se intensifican bandas de entre 50 y 60 kDa, entre 30 y 40 y las de menor masa molecular (alrededor de 20 kDa) (**Figura 1.1.A, calle 7**), lo que podría estar relacionado con la ruptura de agregados de globulina-p de acuerdo con lo descrito en la Introducción General. Cuando el aislado fue incubado con los fluidos gastrointestinales en ausencia de enzimas (**Ac2,3**), las bandas correspondientes a masas moleculares mayores a 20 kDa disminuyeron su intensidad en ausencia de 2-ME (**Figura 1.1.A, calle 2**). Dado que las muestras fueron preparadas y sembradas en el gel de manera tal de tener similar masa de polipéptidos en caso de solubilización completa de los mismos en el buffer muestra de electroforesis, estos resultados sugieren una insolubilización de los polipéptidos (posiblemente por agregación) debida a los tratamientos con los fluidos gastrointestinales, en correlación con la disminución de solubilidad proteica previamente descrita, que no logra ser revertida por la presencia de SDS en el buffer muestra de electroforesis. Cuando las muestras fueron tratadas con 2-ME, el perfil electroforético de **Ac2,3** (**Figura 1.1.A, calle 8**) fue similar al de **A**, presentando únicamente una intensidad algo menor las bandas de más de 45 kDa. Estos resultados sugieren que la agregación estuvo mediada (al menos parcialmente) por puentes disulfuro. Luego de la digestión gastrointestinal simulada, se observó una fuerte disminución en la intensidad de todas las bandas en todos los digeridos; de hecho, no se pudieron observar bandas con la coloración de Coomassie Blue (no mostrado). Algunas bandas aparecieron en la coloración con plata, demostrando que algunos polipéptidos permanecieron sin ser hidrolizados (**Figura 1.1.A, calles 3, 4 y 5**). Se registraron algunas diferencias entre los digeridos en la cantidad relativa de cada uno de los polipéptidos remanentes. Por ejemplo, **Ad1** presentó mayor intensidad que **Ad2** y **Ad3** en bandas correspondientes a polipéptidos mayores de 45 kDa, mientras que **Ad3** mostró mayor abundancia que **Ad1** y **Ad2** de polipéptidos entre 20 y 30 kDa y menores (**Figura 1.1.A, calles 3 y 5**). Sin embargo, es importante tener en cuenta que la cantidad de polipéptidos intactos detectada es muy baja (la sensibilidad de la tinción con plata está en el orden de 0,5-1 ng, mientras que la cantidad total de proteína sembrada en los geles fue del orden de 30 µg), indicando una muy baja proporción de polipéptidos no hidrolizados en todos los casos.

Se realizaron corridas en geles de tricina-SDS-PAGE a fin de poder observar la composición de péptidos de baja masa molecular. **A** presentó bandas correspondientes a masas moleculares mayores a 30 kDa en la parte superior del gel correspondientes a las subunidades ácidas de la globulina 11S y otras mayores que no ingresan, así como otras entre 20 y 30 kDa (polipéptido básico de la globulina 11S) y diversas moléculas menores correspondientes a albúminas, incluyendo una banda de alrededor de 6 kDa (Orsini Delgado y col., 2011) (**Figura 1.2, calle 1**). Igual que en el caso de la SDS-PAGE, se observaron modificaciones luego del tratamiento con los fluidos oral, gástrico e intestinal sin enzimas (**Ac2,3**), tales como disminución de la intensidad de varias bandas, especialmente aquellas de masas moleculares mayores a 16,95 kDa, y aparición de otras de mayores masas que permanecen en el gel espaciador (**Figura 1.2, calle 2**). Luego de la digestión enzimática, todas las bandas disminuyeron su intensidad, permaneciendo detectables

solo algunas (**Figura 1.2, calles 3, 4 y 5**). Los resultados indican que la hidrólisis proteica produjo principalmente péptidos de baja masa molecular (menor a 6 kDa) que no pudieron ser detectados en el gel. Nuevamente, se pueden evidenciar algunas diferencias entre los distintos digeridos, las más importantes fueron la mayor la intensidad de una banda algo mayor a 30 kDa y otra de alrededor de 16 kDa en el caso de **Ad3**, mientras que Ad1 mostró mayor intensidad en bandas de mayor masa que no ingresan al gel separador. En este caso, la coloración con plata no mostró información adicional respecto a la de Coomassie Blue.

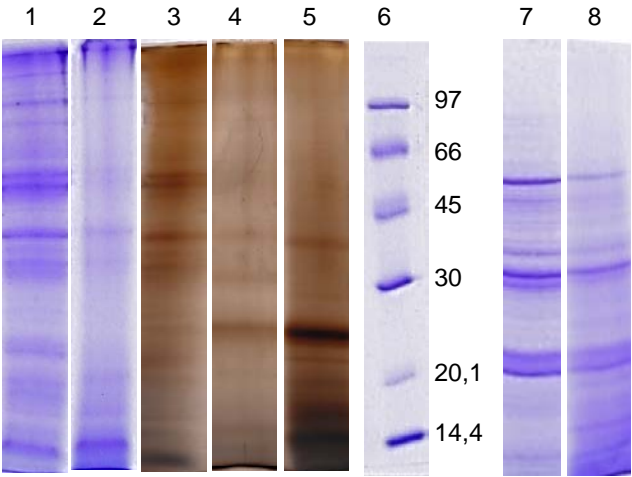


Figura 1.1. SDS-PAGE de las muestras liofilizadas. En ausencia de 2-ME: **A** (calle 1) y **Ac,3** (calle 2) (tinción con Coomassie Blue), **Ad1** (calle 3), **Ad2** (calle 4), **Ad3** (calle 5) (tinción con plata). En presencia de 2-ME: **A** (calle 7) y **Ac2,3** (calle 8). Calle 6: patrón de baja masa molecular.

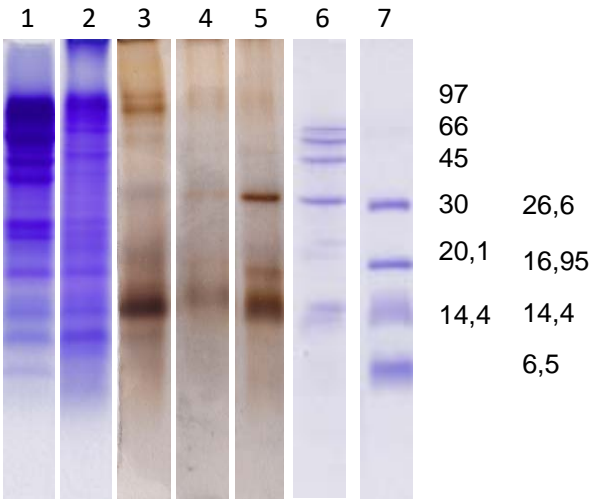


Figura 1.2. Tricina-SDS-PAGE de las muestras liofilizadas. En ausencia de 2-ME: **A** (calle 1) y **Ac,3** (calle 2) (tinción con Coomassie Blue), **Ad1** (calle 3), **Ad2** (calle 4), **Ad3** (calle 5) (tinción con plata). En presencia de 2-ME: **A** (calle 7) y **Ac,3** (calle 8). Calle 6: patrón de baja masa molecular.

Las electroforesis muestran dos conclusiones importantes: 1) el tratamiento con fluidos gastrointestinales producen insolubilización por agregación de polipéptidos de más de 20 kDa

mediada al menos parcialmente por puentes disulfuro; 2) la composición peptídica de los tres digeridos presenta solo algunas pequeñas diferencias en las cantidades relativas de los polipéptidos que permanecen sin hidrolizar, en el caso de **Ad1** permanecen sin hidrolizar mayor proporción de polipéptidos mayores a 45 kDa y en el caso de **Ad3** se observa mayor permanencia de polipéptidos menores a 25 kDa; 3) para los tres digeridos analizados los productos de hidrólisis son fundamentalmente péptidos con masas moleculares menores a 6 kDa

La composición molecular de las fracciones solubles in buffer fosfato 35 mM (pH = 7,8) fue analizada mediante cromatografía de filtración en gel usando una columna Superdex Peptide 10/300 GL (analítica) que permite visualizar moléculas menores a 10 kDa. De esta manera, también fue posible comprobar el efecto del tratamiento de **A** con los fluidos gastrointestinales (según Minekus y col., 2014) sin enzimas (**Ac2,3**), evidenciándose una disminución muy importante en el pico correspondiente al volumen de exclusión de la columna (masas moleculares > 10 kDa) y, dado que los cromatogramas fueron normalizados a igual masa de proteína, un incremento relativo de la intensidad de las moléculas de bajas masas moleculares solubles (**Figura 1.3.A**). Por lo tanto, la disminución de solubilidad registrada para esta muestra involucra fundamentalmente moléculas mayores a 10 kDa, lo cual está de acuerdo con lo observado en las electroforesis. Un efecto similar había sido ya registrado para **Ac1** (Orsini Delgado y col., 2011), sugiriendo que diferentes condiciones de los fluidos gastrointestinales (distinta composición y concentración de sales, distintos pHs, distintos tiempos de incubación) produjeron cambios comparables en las proteínas, presumiblemente la agregación de globulina-p.

Luego del tratamiento con las proteasas digestivas, los tres digeridos presentaron un incremento importante de moléculas con masas menores a 6,5 kDa, mientras que las moléculas de mayores masas (> 10 kDa) disminuyen fuertemente, permaneciendo solo pequeños picos (**Figura 1.3.B, picos 1 y 2**). En la **Tabla** adosada a la **Figura 1.3** pueden apreciarse las áreas relativas correspondientes a cada pico en cada uno de los digeridos. Los picos 1 y 2 presentaron menor área relativa en **Ad1** respecto a los otros digeridos. Para todos los digeridos, la mayor abundancia de moléculas correspondió al rango de masas moleculares entre 0,67 y 4,2 kDa (pico 4) con intensidad máxima correspondiente a alrededor de 1,7 kDa (alrededor de 15 aminoácidos). Se observaron solo pequeñas diferencias entre los digeridos en las áreas % de las moléculas de baja masa molecular, tales como mayores áreas relativas para los picos 4 y 6 en el caso de **Ad1** (**Tabla en Figura 1.3**). Con el fin de evaluar el aporte de los jugos gastrointestinales a las fracciones solubles se preparó un sistema blanco de reactivos (BR) en el que se realizaron todos los pasos del proceso de digestión en idénticas condiciones (para protocolos 2 y 3) pero sin agregado de muestra. Como puede observarse en la **Figura 1.3.C**, la fracción soluble de BR no aporta significativamente a los picos registrados en los digeridos.

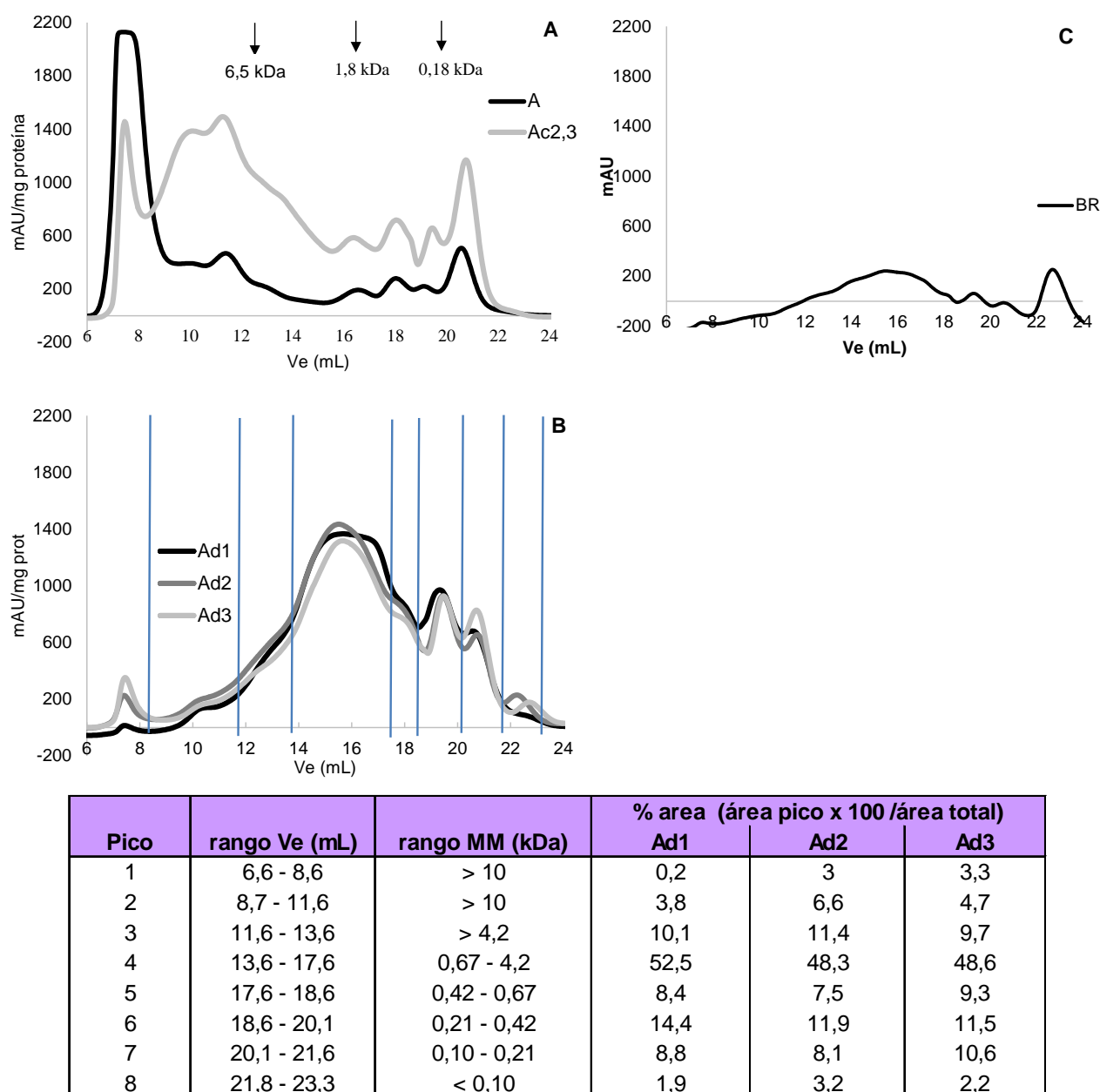


Figura 1.3. Cromatografía FPLC de filtración en gel en columna Superdex Peptide de las fracciones solubles en buffer fostato 35 mM, pH = 7,8. En la Tabla se muestran las masas moleculares y áreas relativas de cada uno de los picos en los digeridos (Figura B).

Dentro de la red COST INGOGEST antes mencionada, se realizaron estudios inter-laboratorios a fin de comparar resultados de digestiones realizadas con distintos métodos de dichos laboratorios y con el método estandarizado (Minekus y col., 2014). Se estudió la digestión gastrointestinal de un polvo de leche descremada. Las electroforesis SDS-PAGE realizadas luego de la fase gástrica y de la fase intestinal muestran una gran diversidad de perfiles entre los protocolos de los laboratorios, con mayor o menor similitud con perfiles obtenidos al aplicar el protocolo estandarizado. Por otra parte, la aplicación del protocolo de consenso en los distintos laboratorios logró disminuir en gran medida la variabilidad (Egger y col., 2016). En nuestro caso, los resultados obtenidos respecto a la caracterización de los tres digeridos indican que las diferentes condiciones



de digestión gastrointestinal evaluadas, tanto en lo que refiere a propiedades de los fluidos, como a actividades enzimáticas y tiempos de incubación, no tuvieron una influencia significativa en el grado de hidrólisis proteica alcanzado, generando digeridos con composiciones moleculares que presentan solo algunas leves diferencias respecto a la abundancia de algunos polipéptidos no hidrolizados y de algunos péptidos generados por la hidrólisis.

### 1.A.2 Actividad de los digeridos y sus fracciones frente a radicales libres en sistemas químicos

Como ya fue antes mencionado, en trabajos previos se demostró que el digerido **Ad1** presentaba actividad para neutralizar o inhibir la formación de distintas ROS y RNS (Orsini Delgado y co.l, 2015) (Orsini Delgado y col., 2015). En este trabajo se comparó la actividad de **Ad1** con la de los otros dos digeridos mediante dos metodologías *in vitro* acelulares: ORAC y HORAC. En primer lugar, se evaluó la actividad de las fracciones solubles (en buffer fosfato 35 mM, pH = 7,8) completas de los digeridos en comparación con las muestras no hidrolizadas, obteniendo curvas dosis respuesta (% de inhibición de radicales peroxilos (ROO $\cdot$ ) frente a la concentración proteica) (**Figura 1.4.A**), las cuales fueron ajustadas según un modelo no lineal sigmoideal (**Figura 1.4.B**)

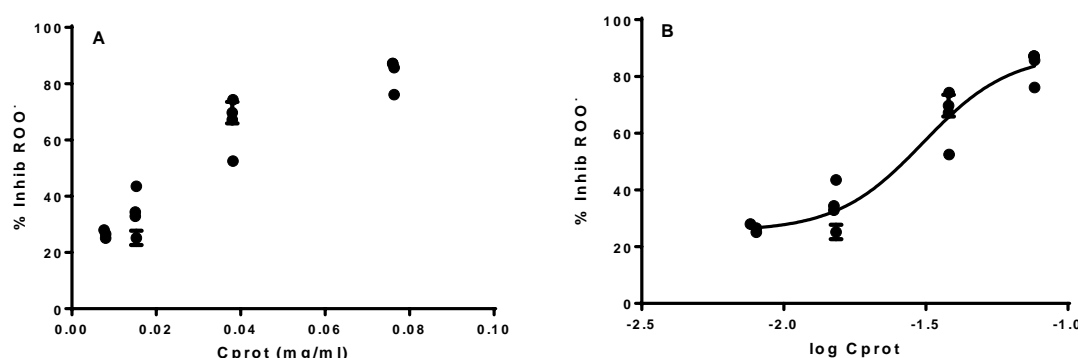


Figura 1.4. Curvas dosis-respuesta para el método ORAC (A) y su ajuste según el modelo no lineal sigmoideal (B). Se muestra para Id2 a modo de ejemplo.

A partir estas curvas se calculó el valor de la dosis inhibitoria del 50 % (IC<sub>50</sub>). Los valores de IC<sub>50</sub> obtenidos se muestran en la **Tabla 1.3**. El tratamiento con los fluidos gastrointestinales sin enzimas (**Ac2,3**) produjeron un incremento significativo ( $p < 0,05$ ) en la potencia ORAC (menor valor de IC<sub>50</sub>) de los solubles, lo cual podría estar relacionado con el enriquecimiento de estas fracciones en moléculas de baja masa molecular como se describió en la sección anterior. Un comportamiento similar fue informado para el control **Ac1** (Orsini Delgado y col., 2011). Luego de la digestión gastrointestinal simulada, los valores de IC<sub>50</sub> fueron aún menores, o sea la potencia ORAC aumentó, y no se registraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los tres digeridos (**Tabla 1.3**).

Tabla 1.3. Valores  $IC_{50}$  para las fracciones solubles de las muestras (métodos ORAC y HORAC).

Muestra	ORAC $IC_{50}$ (mg/mL)	HORAC $IC_{50}$ (mg/mL)
<b>A</b>	0.12 (0.10-0.16) <sup>c*</sup>	2.29 (2.07-2.54) <sup>*c</sup>
<b>Ac<sub>2,3</sub></b>	0.050 (0.047-0.053) <sup>b</sup>	3.37 (3.19-3.56) <sup>d</sup>
<b>Ad<sub>1</sub></b>	0.024 (0.023-0.026) <sup>a</sup>	1.13 (1.03-1.23) <sup>a</sup>
<b>Ad<sub>2</sub></b>	0.023 (0.020-0.026) <sup>a</sup>	1.50 (1.41-1.59) <sup>a,b</sup>
<b>Ad<sub>3</sub></b>	0.024 (0.018-0.032) <sup>a</sup>	1.61 (1.55-1.67) <sup>b</sup>

Valores obtenidos a partir del modelo sigmoidal. Entre paréntesis se muestran los intervalos del 95 % de confianza.

Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ )

\*Orsini Delgado y col, 2015

Para el ensayo HORAC, también se obtuvieron curvas dosis-respuesta (**Figura 1.5.A**) que fueron ajustadas mediante el modelo no lineal sigmoidal (**Figura 1.5.B**). Cabe remarcar que las concentraciones usadas en este caso son mucho mayores que para el método ORAC (Orsini Delgado y col., 2015).

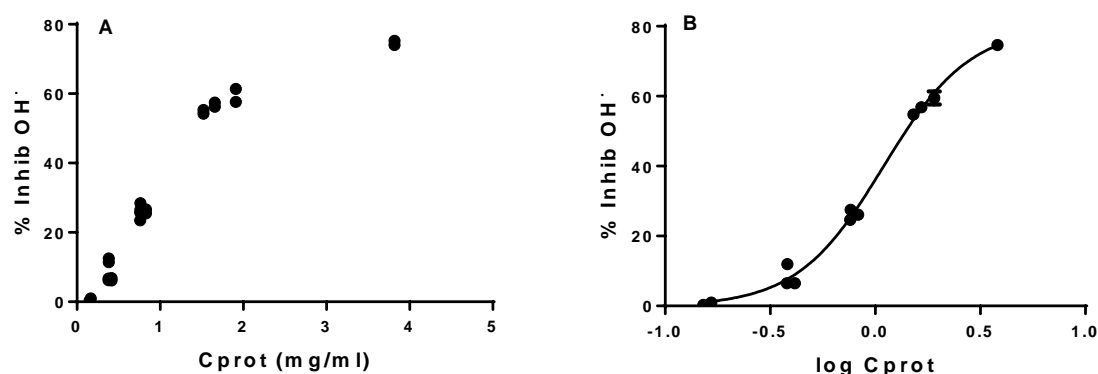


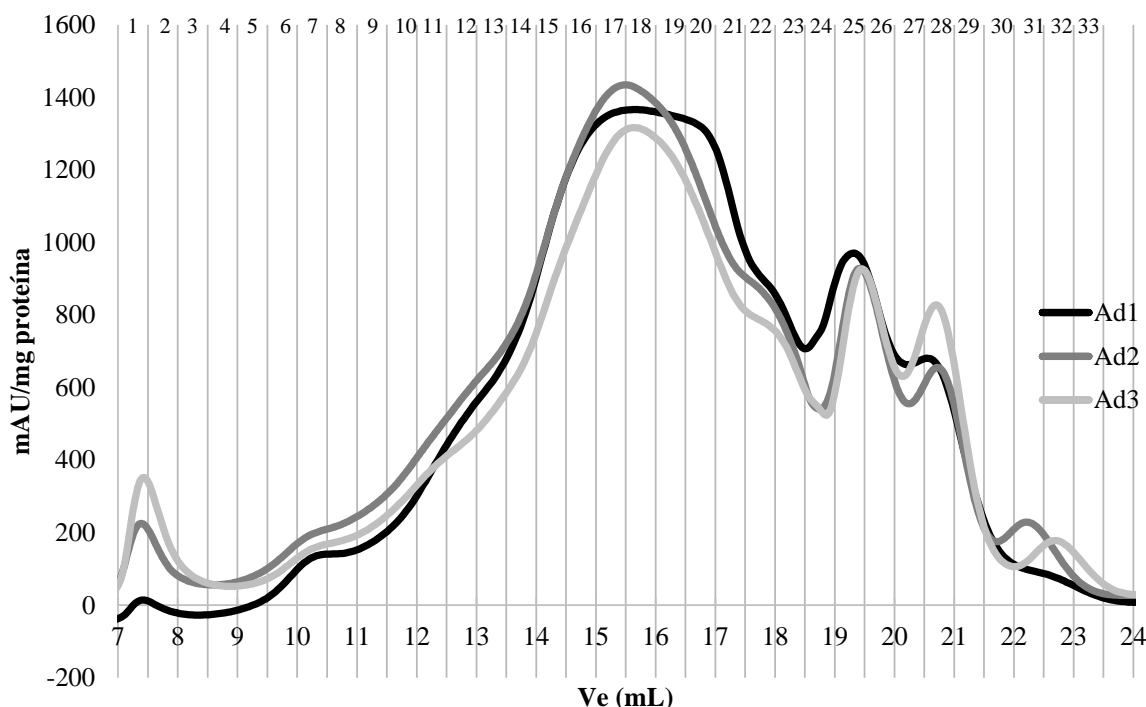
Figura 1.5. Curvas dosis-respuesta para el método HORAC (A) y su ajuste según el modelo no lineal sigmoidal (B). Se muestra para Id2 a modo de ejemplo.

A partir de las curvas se obtuvieron los valores de  $IC_{50}$  (**Tabla 1.3**). **Ac<sub>2,3</sub>** presentó menor potencia que **A**, sugiriendo que en este caso las moléculas no solubles de **Ac<sub>2,3</sub>** tenían un aporte más importante a la actividad. Todos los digeridos presentaron un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) en la potencia HORAC, registrándose solo una pequeña pero significativa diferencia en el valor  $IC_{50}$  de **Ad<sub>1</sub>** respecto de **Ad<sub>3</sub>** (**Tabla 1.3**).

Como puede observarse, los efectos de los distintos tratamientos realizados a las muestras generaron algunas diferencias en el comportamiento frente a los ensayos ORAC y HORAC. Estas diferencias pueden estar relacionadas con el mecanismo de acción de las moléculas antioxidantes en cada ensayo. Se ha demostrado que el ensayo ORAC evalúa la capacidad de antioxidantes “interruptores de cadena” frente al radical  $ROO\bullet$  a través del mecanismo de transferencia de un

átomo de hidrógeno (Ou y col., 2001). Por otro lado, el ensayo HORAC evidencia fundamentalmente la capacidad de quelar metales inhibiendo la formación de radicales OH• (Ou y col., 2002), aunque otros autores no descartan que se evalúe una combinación de la inhibición de la formación y de la capacidad de neutralizar radicales formados (Ma y col., 2010).

A fin de analizar la contribución de diferentes péptidos/polipéptidos a la actividad antioxidante, se separaron fracciones a partir de las corridas FPLC de filtración en gel de las fracciones solubles en buffer fosfato 35 mM (pH = 7,8), tal como se observa en la **Figura 1.6**.



*Figura 1.6. Separación de fracciones por cromatografía FPLC de filtración en gel a partir de las fracciones solubles de los digeridos en buffer fosfato 35 mM (pH = 7,8).*

La concentración de péptidos/polipéptidos de las fracciones fue evaluada mediante el método de Lowry o una modificación del mismo en algunos casos de manera de lograr mayor sensibilidad en la detección (Stoscheck, 1990). Los resultados obtenidos junto con los rangos de masas moleculares correspondientes a cada fracción calculados a partir de la calibración realizada a la columna pueden observarse en la **Tabla 1.4**. Estos resultados muestran algunas diferencias en la composición final de los péptidos generados por los distintos protocolos de digestión. Entre las principales diferencias pueden mencionarse: una mayor concentración peptídica en las fracciones correspondientes a MM > 10 kDa y en aquellas con masas entre 0,17 y 0,27 kDa (fracciones 26 y 17) en el caso de **Ad3**, mientras que **Ad1** presentó mayores concentraciones en fracciones que corresponden a MM entre 0,34 y 7 kDa (fracciones 12 a 25). **Ad2** presentó valores intermedios entre **Ad1** y **Ad3** para algunas fracciones, mientras que en otros casos se asemejaron más a alguno de los otros digeridos (**Ad1** o **Ad3**).

La actividad antioxidante de estas fracciones fue evaluada mediante los ensayos ORAC y HORAC. En la **Tabla 1.5** se muestran los resultados obtenidos al evaluar la neutralización de radicales ROO<sup>•</sup> (ensayo ORAC). En los tres digeridos se observan altos % de inhibición (mayores al 60 %) para las fracciones entre 6 y 32, presentando las fracciones 15 a 29 (0,11 – 3,5 kDa) las mayores actividades ( $\geq 90$  % inhibición). Para todas estas fracciones, **Ad3** presentó valores algo menores que los otros digeridos; sin embargo este digerido registró mayores % de inhibición para las fracciones 1 a 10.

*Tabla 1.4. Rangos de masas moleculares y concentraciones peptídicas de las fracciones FPLC separadas a partir de los tres digeridos*

Fracción	Vi (mL)	rango MM (kDa)	Cpept (µg/mL)		
			Ad1	Ad2	Ad3
1	7,02	> 10	40 ± 6	68 ± 2	100 ± 10
2	7,52	> 10	35 ± 6	30 ± 0	95 ± 4
3	8,02	> 10	15 ± 0	30 ± 0	46 ± 4
4	8,52	> 10	38 ± 0	22 ± 4	62 ± 7
5	9,02	> 10	33 ± 1	52 ± 10	75 ± 2
6	9,52	> 10	60 ± 8	98 ± 10	48 ± 15
7	10,02	> 10	99 ± 3	140 ± 12	123 ± 1
8	10,52	> 10	106 ± 5	166 ± 40	146 ± 5
9	11,02	> 10	146 ± 1	206 ± 22	163 ± 7
10	11,52	8,8 - > 10	171 ± 1	246 ± 6	236 ± 13
11	12,02	7,0 - 8,8	217 ± 40	312 ± 20	253 ± 22
12	12,52	5,6 - 7,0	269 ± 8	352 ± 24	249 ± 3
13	13,02	4,4 - 7,0	346 ± 10	360 ± 6	323 ± 4
14	13,52	3,5 - 7,0	371 ± 30	390 ± 10	291 ± 34
15	14,02	2,8 - 3,5	474 ± 10	458 ± 8	394 ± 7
16	14,52	2,2 - 3,5	562 ± 40	470 ± 20	468 ± 47
17	15,02	1,7 - 2,2	630 ± 20	540 ± 26	477 ± 32
18	15,52	1,4 - 1,7	600 ± 20	550 ± 42	418 ± 11
19	16,02	1,1 - 1,4	546 ± 20	488 ± 32	400 ± 16
20	16,52	0,87 - 1,1	449 ± 30	436 ± 6	408 ± 14
21	17,02	0,69 - 0,87	364 ± 7	278 ± 20	138 ± 39
22	17,52	0,55 - 0,69	209 ± 6	248 ± 20	181 ± 10
23	18,02	0,43 - 0,55	170 ± 8	208 ± 12	138 ± 7
24	18,52	0,34 - 0,43	160 ± 10	174 ± 2	125 ± 15
25	19,02	0,27 - 0,34	130 ± 2	142 ± 2	84 ± 7
26	19,52	0,22 - 0,27	103 ± 1	80 ± 2	205 ± 14
27	20,02	0,17 - 0,22	260 ± 1	210 ± 8	386 ± 19
28	20,52	0,14 - 0,17	516 ± 4	466 ± 8	429 ± 7
29	21,02	0,11 - 0,17	223 ± 2	244 ± 6	162 ± 24
30	21,52	< 0,10 - 0,11	36 ± 8	35 ± 7	50 ± 10
31	22,02	< 0,10	25 ± 0	10 ± 2	22 ± 6
32	22,52	< 0,10	17 ± 5	nd	16 ± 3
33	23,02	< 0,10	nd	nd	nd

Diferentes % de inhibición pueden estar relacionados tanto con el tipo de moléculas como con la concentración de las mismas en una muestra. Al calcular un parámetro de potencia antioxidante en el que se refiere a una masa fija de moléculas, pueden evaluarse diferencias dadas por la

capacidad de distintas moléculas. Para este ensayo se calculó el parámetro Trolox equivalente (TE). De esta manera, puede observarse que las fracciones con mayor potencia estuvieron distribuidas en todas las zonas del cromatograma: 4, 5 y 6, 23 a 26, y 30, 31 presentaron los valores más altos de TE en los tres digeridos (con algunas diferencias numéricas entre ellos); en el caso de **Ad3** se agregan las fracciones 1 a 3, 21, 22 y 29 entre las fracciones con mayor potencia en el ensayo ORAC.

*Tabla 1.5. Actividad antioxidante determinada mediante el ensayo ORAC de las fracciones FPLC separadas a partir de los tres digeridos*

Fracción	Ad1		Ad2		Ad3	
	% inhib ROO <sup>•</sup>	TE	% inhib ROO <sup>•</sup>	TE	% inhib ROO <sup>•</sup>	TE
1	32 ± 1	0,39 ± 0,07	42 ± 2	0,78 ± 0,06	71 ± 3	0,60 ± 0,04
2	19,1 ± 0,6	0,4 ± 0,3	41 ± 2	0,86 ± 0,05	67 ± 3	0,79 ± 0,04
3	15,3 ± 0,6	0,5 ± 0,3	34,9 ± 0,1	0,702 ± 0,002	52 ± 2	0,91 ± 0,04
4	22,1 ± 0,3	0,9 ± 0,5	45 ± 3	1,3 ± 0,1	56 ± 3	0,85 ± 0,05
5	36,9 ± 0,9	0,9 ± 0,3	59 ± 5	1,5 ± 0,2	70 ± 1	0,79 ± 0,01
6	67 ± 2	0,86 ± 0,08	60,2 ± 0,1	0,846 ± 0,002	75 ± 1	1,32 ± 0,03
7	78 ± 1	0,583 ± 0,004	75 ± 1	0,75 ± 0,02	79,0 ± 0,6	0,549 ± 0,005
8	78 ± 2	0,56 ± 0,01	73 ± 1	0,59 ± 0,01	82 ± 3	0,49 ± 0,02
9	81 ± 2	0,4 ± 0,01	75 ± 1	0,52 ± 0,01	85,6 ± 0,1	0,454 ± 0,001
10	82 ± 1	0,363 ± 0,001	79,5 ± 0,5	0,467 ± 0,003	93 ± 2	0,34 ± 0,01
11	83 ± 5	0,53 ± 0,04	87 ± 1	0,404 ± 0,005	82,2 ± 0,4	0,559 ± 0,003
12	85,2 ± 0,3	0,443 ± 0,002	89,0 ± 0,2	0,367 ± 0,001	82 ± 1	0,56 ± 0,01
13	87 ± 3	0,36 ± 0,01	91,5 ± 0,8	0,374 ± 0,004	84 ± 5	0,45 ± 0,03
14	89,3 ± 0,8	0,339 ± 0,004	94 ± 2	0,35 ± 0,01	88,8 ± 0,7	0,530 ± 0,005
15	94,56 ± 0,02	0,2845 ± 0,0001	96 ± 1	0,309 ± 0,005	89,5 ± 0,4	0,395 ± 0,002
16	96,6 ± 0,4	0,246 ± 0,001	96,19 ± 0,05	0,3026 ± 0,0002	91 ± 2	0,34 ± 0,01
17	97 ± 2	0,221 ± 0,005	95,91 ± 0,09	0,2620 ± 0,0003	92,0 ± 0,9	0,336 ± 0,004
18	98 ± 1	0,233 ± 0,003	95,3 ± 0,2	0,2557 ± 0,0007	89 ± 1	0,37 ± 0,01
19	97,4 ± 0,1	0,2555 ± 0,0004	95,0 ± 0,1	0,2875 ± 0,0003	88 ± 1	0,38 ± 0,01
20	98 ± 2	0,31 ± 0,01	93 ± 1	0,314 ± 0,004	88 ± 1	0,37 ± 0,01
21	97,0 ± 0,7	0,381 ± 0,003	91,6 ± 0,6	0,483 ± 0,003	90,1 ± 0,2	1,138 ± 0,002
22	96,1 ± 0,3	0,657 ± 0,002	95,5 ± 0,9	0,568 ± 0,006	92 ± 3	0,88 ± 0,03
23	95,8 ± 0,5	0,803 ± 0,004	95,7 ± 0,1	0,6814 ± 0,0008	92,7 ± 0,4	1,17 ± 0,01
24	97 ± 1	0,87 ± 0,01	95,8 ± 0,9	0,813 ± 0,008	90 ± 4	1,25 ± 0,05
25	94,4 ± 0,9	1,04 ± 0,01	94,8 ± 0,5	0,988 ± 0,006	86 ± 1	1,77 ± 0,02
26	93,5 ± 0,4	1,30 ± 0,01	92,4 ± 0,7	1,7 ± 0,1	89 ± 1	0,76 ± 0,01
27	96,2 ± 0,8	0,53 ± 0,01	95,3 ± 0,7	0,67 ± 0,005	90,8 ± 0,1	0,4098 ± 0,0003
28	98 ± 2	0,271 ± 0,005	97,5 ± 0,5	0,310 ± 0,002	91,8 ± 0,4	0,373 ± 0,002
29	94 ± 1	0,60 ± 0,01	95 ± 2	0,57 ± 0,01	88,3 ± 0,2	0,946 ± 0,002
30	89 ± 3	1,80 ± 0,02	77 ± 1	1,59 ± 0,03	85,3 ± 0,7	1,48 ± 0,01
31	82 ± 5	2,3 ± 0,1	66 ± 4	4,7 ± 0,4	74 ± 8	2,8 ± 0,3
32	78 ± 7	3,0 ± 0,2	53 ± 3	nd	68 ± 7	3,5 ± 0,4
33	47 ± 3	nd	35 ± 5	nd	45 ± 1	nd

TE = Trolox Equivalente =  $\mu\text{moles Trolox/mg proteína}$

nd = no determinado debido a que la concentración peptídica no fue detectable

En el caso del ensayo HORAC, solo pudo detectarse actividad (con bajos % de inhibición de radicales OH<sup>•</sup>) para las fracciones 15 a 23 (MM entre 0,43 y 3,5 kDa) en el caso de **Ad2** y **Ad3** y 15 a 22 para **Ad1**, las cuales corresponden a las mayores concentraciones de péptidos generados por la digestión. Para el resto de las fracciones, probablemente sus concentraciones no fueron

suficientes para mostrar actividad por este ensayo que, como se mencionó anteriormente requiere concentraciones más altas de péptidos. **Ad3** presentó las 3 fracciones más potentes (21 a 23) según los valores de ácido clorogénico equivalente (ACE) (**Tabla 1.6**)

Si bien tanto para el método ORAC como HORAC pudieron observarse algunas leves diferencias en las actividades de cada fracción, en términos generales se observaron similares comportamientos para **Ad1**, **Ad2** y **Ad3**. Si bien para conocer la composición de cada una de las fracciones sería necesario realizar la identificación de los péptidos constituyentes, estos resultados sugieren que habría una importante similitud de composición de las fracciones.

*Tabla 1.6. Actividad antioxidante determinada mediante el ensayo HORAC de las fracciones FPLC separadas a partir de los tres digeridos*

Fracción	Ad1		Ad2		Ad3	
	% inhib OH <sup>·</sup>	ACE	% inhib OH <sup>·</sup>	ACE	% inhib OH <sup>·</sup>	ACE
15	9,7 ± 0,2	0,109 ± 0,002	8,6 ± 0,9	0,12 ± 0,01	10,2 ± 0,6	0,15 ± 0,01
16	14 ± 3	0,10 ± 0,02	13,39 ± 0,01	0,184 ± 0,001	12,5 ± 0,6	0,141 ± 0,004
17	20 ± 0,5	0,148 ± 0,003	15,7 ± 0,5	0,19 ± 0,01	13,3	0,07
18	17,6 ± 0,1	0,140 ± 0,001	14,0 ± 0,7	0,16 ± 0,01	17 ± 5	0,20 ± 0,04
19	18,55 ± 0,007	0,161 ± 0,001	15,7 ± 0,2	0,207 ± 0,003	13 ± 3	0,17 ± 0,02
20	20 ± 3	0,2 ± 0,03	17,0 ± 0,5	0,25 ± 0,01	13,96 ± 0,02	0,174 ± 0,001
21	15,9 ± 0,4	0,211 ± 0,005	11,0 ± 0,4	0,26 ± 0,01	14,2 ± 0,5	0,52 ± 0,01
22	8,8 ± 0,9	0,20 ± 0,02	11 ± 1	0,28 ± 0,04	12,50 ± 0,02	0,366 ± 0,001
23	na	na	8,8 ± 0,9	0,28 ± 0,03	9,0 ± 0,4	0,39 ± 0,01

ACE = Acido clorogénico Equivalente = mg ácido clorogénico/mg proteína

## 1.B. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE FRACCIONES A PARTIR DE DIGERIDO GASTROINTESTINAL DE AISLADO DE AMARANTO (*Ad*).

Dado que el resto de este trabajo de Tesis fue realizado utilizando el digerido **Ad1**, llamado **Ad** a partir de ahora, a continuación se presenta la composición centesimal del mismo en comparación con **A** (Tabla 1.7). **Ad** presentó un aumento de las cenizas por el agregado de sales presentes en los fluidos estomacal e intestinal, con una consecuente disminución en el contenido de lípidos y de proteínas en menor medida ya que hay agregado de enzimas. Los glúcidos mostraron un leve aumento que podría estar relacionado con alguna cuestión metodológica o con un pequeño aporte de la pancreatina, aunque no se dispone de información al respecto.

Tabla 1.7. Composición centesimal de A y Ad liofilizados

% p/p, base húmeda	A	Ad
<b>Humedad</b>	8,55 ± 0,06	5,9 ± 0,1
<b>Cenizas</b>	2,6 ± 0,1	15,6 ± 0,8
<b>Lípidos</b>	1,2 ± 0,1	0,6 ± 0,1
<b>Hidratos de Carbono</b>	8,3 ± 0,2	10,9 ± 0,7
<b>Proteínas</b>	78,39 ± 0,05	67 ± 2

### 1.B.1. Cromatografía de exclusión molecular FPLC

A fin de obtener fracciones en cantidades suficientes para el desarrollo de este trabajo, se realizaron diversas corridas de la fracción soluble (10 mg/mL) de **Ad** mediante FPLC de filtración en gel utilizando una columna Superdex 30 semi-preparativa.

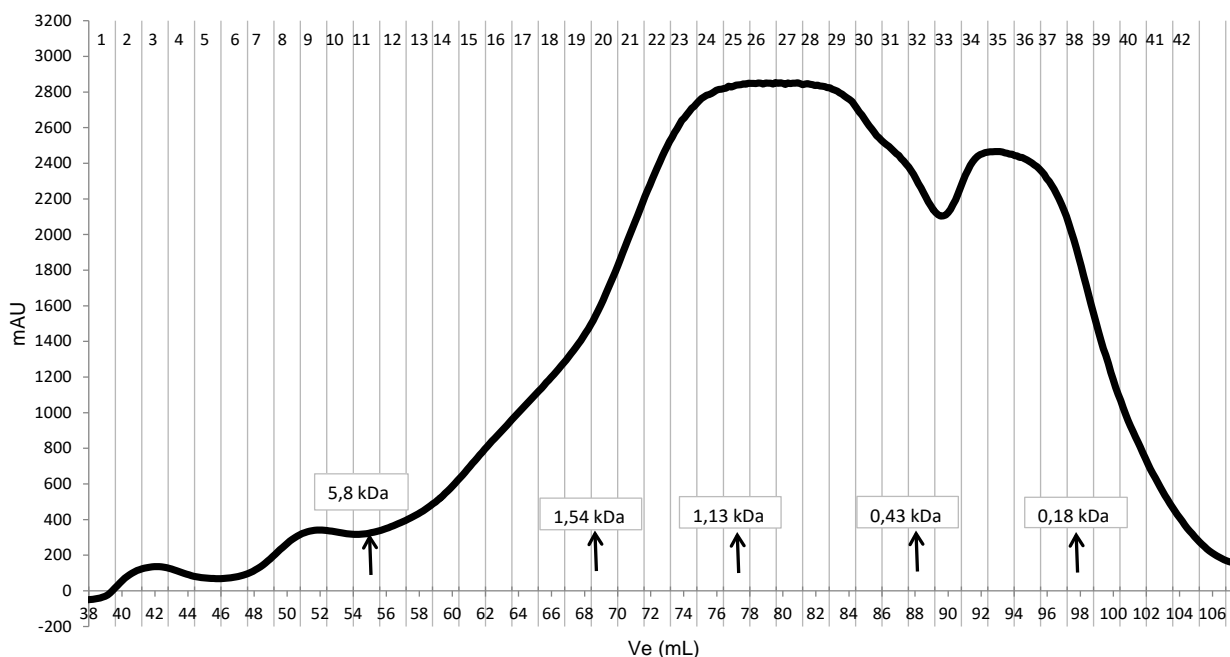


Figura 1.7. Cromatograma FPLC de filtración en gel (Superdex 30) de **Ad** mostrando las fracciones recolectadas.

En la **Figura 1.7** se muestra el cromatograma obtenido indicando las fracciones colectadas. Como puede observarse, el cromatograma presenta un perfil similar al obtenido en la columna analítica para **Ad1 (Figura 1.3.B)** aunque con mayor solapamiento de los picos.

*Tabla 1.7. Masas moleculares y concentración peptídica de las fracciones FPLC de Ad.*

Fracción	Vi (mL)	rango MM (kDa)	Cpept (mg/mL)
1	38,4	> 10	nd
2	40,0	> 10	nd
3	41,6	> 10	nd
4	43,2	> 10	nd
5	44,8	> 10	nd
6	46,4	9,5 - >10	nd
7	48,0	8,4 - 9,5	nd
8	49,6	7,4 - 8,4	0,024 ± 0,007
9	51,2	6,5 - 7,4	0,046 ± 0,001
10	52,8	5,7 - 6,5	0,065 ± 0,008
11	54,4	5,1 - 5,7	0,084 ± 0,008
12	56,0	4,4 - 5,1	0,122 ± 0,002
13	57,6	3,9 - 4,4	0,156 ± 0,005
14	59,2	3,5 - 3,9	0,176 ± 0,008
15	60,8	3,0 - 3,5	0,151 ± 0,004
16	62,4	2,7 - 3,0	0,180 ± 0,002
17	64,0	2,4 - 2,7	0,13 ± 0,01
18	65,6	2,1 - 2,4	0,27 ± 0,03
19	67,2	1,8 - 2,1	0,19 ± 0,07
20	68,8	1,6 - 1,8	0,232 ± 0,006
21	70,4	1,4 - 1,6	0,31 ± 0,08
22	72,0	1,25 - 1,4	0,32 ± 0,03
23	73,6	1,1 - 1,25	0,3 ± 0,08
24	75,2	0,97 - 1,1	0,29 ± 0,03
25	76,8	0,86 - 0,97	0,26 ± 0,03
26	78,4	0,75 - 0,86	0,32 ± 0,02
27	80,0	0,66 - 0,75	0,188 ± 0,007
28	81,6	0,59 - 0,66	0,3 ± 0,01
29	83,2	0,52 - 0,59	0,1 ± 0,01
30	84,8	0,45 - 0,52	0,05 ± 0,01
31	86,4	0,40 - 0,45	0,09 ± 0,01
32	88,0	0,35 - 0,40	0,054 ± 0,001
33	89,6	0,31 - 0,35	0,015 ± 0,006
34	91,2	0,27 - 0,31	0,09 ± 0,01
35	92,8	0,24 - 0,27	0,27 ± 0,04
36	94,4	0,21 - 0,24	0,271 ± 0,002
37	96,0	0,19 - 0,21	0,32 ± 0,04
38	97,6	0,16 - 0,19	nd
39	99,2	0,14 - 0,16	nd
40	100,8	0,13 - 0,14	nd
41	102,4	0,11 - 0,13	nd
42	104,0	< 0,11	nd

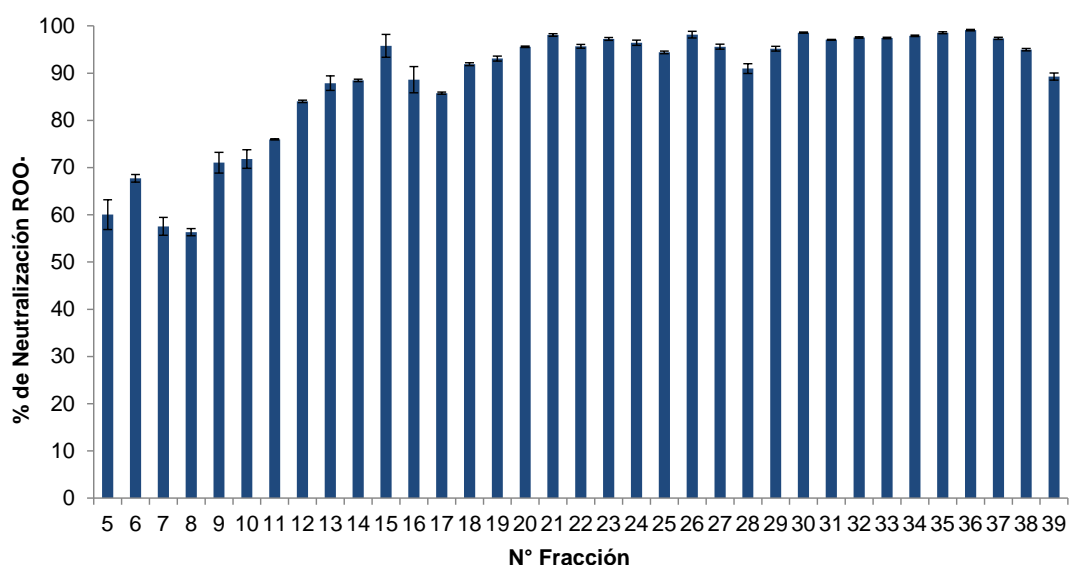
*nd: no detectable por el método de Lowry*



Los rangos de masas moleculares (obtenidos a partir de la calibración) así como la concentración peptídica (método de Lowry) correspondientes a cada fracción se informan en la **Tabla 1.7**. Las fracciones con mayor contenido de péptidos correspondieron a masas moleculares en el rango de 0,6 a 2,4 kDa (18 a 28) y de 0,2 a 0,3 kDa (35 a 37).

### 1.B.2. Actividad antioxidante de las fracciones en sistemas químicos.

Se evaluó la capacidad de las fracciones de inhibir radicales libres en solución, libres de células. En primer término se realizó el ensayo ORAC en el que, de manera similar a lo observado para las fracciones provenientes de la columna FPLC analítica (**Tabla 1.5**), se registraron altos % de inhibición de ROO $\cdot$  para todas las fracciones, superiores al 90 % en muchos casos (**Figura 1.8**). Los valores más altos los presentaron las fracciones 15 y 18 a 39, aunque no puede descartarse que se esté subestimando la actividad en estas fracciones por estar en la zona de saturación de la curva dosis-respuesta.

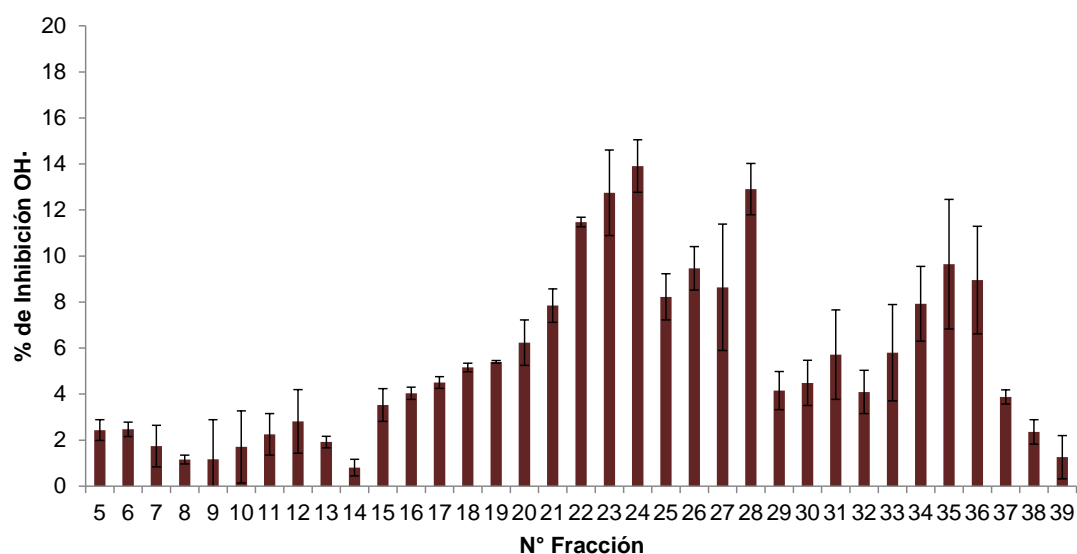


*Figura 1.8. Actividad ORAC de las fracciones FPLC (Superdex 30 prep)*

La capacidad antioxidante dada por un mecanismo de neutralización de radicales libres (esto es, mediante donación de un átomo de hidrógeno o de un electrón) de los hidrolizados proteicos es influenciada por propiedades estructurales tales como composición de aminoácidos, tamaño o masa molecular de los péptidos (Ketnawa y col., 2018). Con respecto a la influencia de la masa molecular, generalmente se asocia a los péptidos de baja masa molecular con una mayor actividad antioxidante (Jin y col., 2016; Yang y col., 2017). La menor capacidad de neutralización de péptidos grandes fue atribuida a un posible impedimento estérico por el tamaño y mayor repulsión de los péptidos voluminosos. Por ejemplo, fracciones de baja masa molecular (1 – 3 kDa) obtenidas por ultrafiltración de hidrolizados proteicos de arroz presentaron mayores capacidades ORAC (Zhou y col., 2013). Sin embargo, otros estudios han demostrado que no

siempre ocurre de esta manera, tal como en hidrolizados de proteínas de soja (Chen y col., 2018), y en péptidos de canola en los que la capacidad de neutralizar radicales libres de los péptidos más grandes fue mayor (Malomo y col., 2013). En el caso del digerido gastrointestinal de amaranto, si bien para poder comparar potencias de las distintas fracciones habría que hacer determinaciones con distintas diluciones de las muestras que caigan por debajo de la zona de máximos % de inhibición en la curva ORAC, si podemos afirmar que se registró considerable actividad ORAC en todo el rango de masas moleculares evaluado, es decir desde péptidos mayores a 10 kDa a moléculas con masas moleculares en el orden de los aminoácidos libres.

También se evaluó la actividad HORAC de las fracciones y, nuevamente en correlación con lo informado previamente para las fracciones separadas en la columna analítica (**Tabla 1.6**), los valores de % de inhibición de OH $\cdot$  fueron muy bajos, siendo las fracciones 22, 23, 24 y 28 las que presentaron mayores % de inhibición de OH $\cdot$  por este método (**Figura 1.9**). Sin embargo, y teniendo en cuenta que los % de inhibición registrados son bajos y pueden estar sujetos a mayor error, si estos valores son normalizados por la concentración peptídica (% inhibición/mg péptidos), se encuentra que los mayores valores de capacidad HORAC los presentan las fracciones 30 a 34 correspondientes a masas moleculares en el rango de 0,31 a 0,45 kDa.



*Figura 1.9. Actividad HORAC de las fracciones FPLC (Superdex 30 prep)*

En la actividad quelante, también existen resultados contradictorios, respecto a la influencia del tamaño molecular, en algunos casos (péptidos de salvado de arroz) se ha registrado mayor actividad para fracciones de mayores masas moleculares (3–5 kDa) que para las de menor (Phongthai y col., 2018), mientras que para otros péptidos (lino) el comportamiento fue inverso (Hwang y col., 2016). Estas diferencias podrían estar asociadas a diferencias de composiciones y secuencias en cada fracción entre distintas muestras (Nwachukwu y Aluko, 2018).

## 1.C. CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS DERIVADOS DE LA DIGESTIÓN GASTROINTESTINAL DE AISLADO DE AMARANTO

### 1.C.1. Propiedades fisicoquímicas de los péptidos

Como se describió en la sección 1.8. de Materiales y Métodos, en trabajos previos en nuestro laboratorio se lograron identificar 10 secuencias peptídicas con potencial actividad antioxidante provenientes de la globulina 11S de amaranto que luego fueron sintetizadas (Orsini Delgado y col., 2016). En la **Tabla 1.8.** se muestran las secuencias de estos péptidos con su masa molecular. Es importante recordar en este punto algunas propiedades de la globulina 11S, dado que todos los péptidos sintetizados pertenecen a dicha proteína. La misma presenta dos formas hexaméricas heterogéneas, con pesos moleculares entre 300 y 360 kDa en su forma nativa (Marccone, 1999), formadas por subunidades de entre 50 y 70 kDa, cada una de las cuales tiene una subunidad ácida (27 – 37 kDa) y una básica (20 – 24 kDa), unidas entre sí por un enlace disulfuro (A-S-S-B)<sub>6</sub> (Adachi y col., 2001 y 2003, Chen y Paredes López, 1997). La mayoría de las cadenas peptídicas sintetizadas (1 a 8, **Tabla 1.8**) pertenecen a la subunidad ácida, mientras que las dos últimas (9 y 10, **Tabla 1.8**) pertenecen a los extremos de la subunidad básica. Todos los péptidos presentan masas moleculares cercanas a 1 kDa, con longitudes de entre 8 y 14 aminoácidos.

*Tabla 1.8. Secuencias, masas moleculares y ubicación en la globulina 11S de los péptidos sintéticos.*

Péptido	Secuencia	MMr	Posición en globulina 11S
1	TEVWDSNEQ	1090,4679	35-43
2	IYIEQGNGITGM	1294,6227	74-86
3	GDRFQDQHQ	1129,4901	118-130
4	LAGKPQQEHSGEHQ	1544,7332	183-199
5	YLAGKPQQEH	1169,5829	235-242
6	LQAEQDDR	973,4465	235-242
7	HVIKPPSRA	1003,5927	253-260
8	AWEEREQGSR	1246,5690	260-269
9	AVNVDDPSK	943,4590	287-297
10	KFNRPETT	991,5074	441-448

En la **Tabla 1.9** se presentan los valores para los distintos parámetros fisicoquímicos obtenidos *in silico* a partir de las secuencias peptídicas. Se observa una importante variabilidad en la proporción de los distintos tipos de aminoácidos, como también valores de punto isoeléctrico (PI) en un rango amplio, lo cual hace que a pH fisiológico (pH = 7,4) algunos de los péptidos presentarán carga negativa, otros carga positiva y uno de ellos será neutro. También se obtuvo el valor GRAVY (*grand average of hydropathy*). El valor GRAVY para un péptido o proteína se calcula como la suma de los valores de hidropatía de todos los aminoácidos de acuerdo a la

escala de Kyte y Doolittle (1982), dividida por el número de residuos en la secuencia. Se comprobó que en el caso de proteínas globulares existe una fuerte correspondencia entre las regiones internas de la secuencia y las regiones que se registran como más hidrofóbicas y entre las regiones más externas y las que aparecen como más hidrofílicas según este parámetro. En el caso de proteínas unidas a membranas, las porciones de sus secuencias localizadas dentro de la bicapa lipídica se correlacionan con áreas hidrofóbicas (Cid y col., 1992). En función de esto, las proteínas pueden ser categorizadas en globulares y de membrana; un score por debajo de 0 estará más probablemente relacionado con proteínas globulares hidrofílicas mientras que un score por encima de 0 corresponderá más probablemente a una proteína hidrofóbica de membrana (Magdeldin y col., 2012). Este parámetro es también utilizado para la caracterización de péptidos (Chang y Yang, 2013; Bagag y col., 2013). De acuerdo con estas consideraciones, podemos observar en la **Tabla 1.9.** que los péptidos 1, 3, 4, 5, 6, 8 y 10 presentan valores GRAVY fuertemente negativos sugiriendo un alto carácter hidrofílico de los mismos, mientras que los péptidos 7 y 9 presentan valores negativos pero muy cercanos a 0 y el péptido 2 muestra un valor apenas por encima de 0 indicando un mayor carácter hidrofóbico del mismo.

*Tabla 1.9. Propiedades fisicoquímicas de los péptidos obtenidas in silico*

Péptido	PI <sup>1</sup>	carga a pH 7,4 <sup>1</sup>	% aminoácidos <sup>1</sup>						GRAVY <sup>1</sup>
			alifáticos	aromáticos	azufrados	básicos	ácidos	alif hidroxilicos	
1	3,42	-	11,1	11,1	0,0	0,0	55,6	22,2	-1744
2	3,85	-	50,0	8,3	8,3	0,0	25,0	8,3	0,142
3	5,41	-	11,1	11,1	0,0	22,2	55,6	0,0	-2533
4	6,50	-	35,7	0,0	0,0	21,4	35,7	7,1	-1814
5	7,54	0	40,0	10,0	0,0	20,0	30,0	0,0	-1530
6	3,88	-	25,0	0,0	0,0	12,5	62,5	0,0	-2050
7	11,65	+	55,5	0,0	0,0	33,3	0,0	11,1	-0,567
8	4,48	-	20,0	10,0	0,0	20,0	40,0	10,0	-2330
9	4,11	-	44,4	0,0	0,0	11,1	33,3	11,1	-0,733
10	9,70	+	12,5	12,5	0,0	25,0	25,0	25,0	-1950

<sup>1</sup>propiedades obtenidas en [http://bioinformatics.org/sms2/protein\\_stats.html](http://bioinformatics.org/sms2/protein_stats.html)

PI = punto isoeléctrico

Aminoácidos alifáticos: G,A,V,L,I,P

Aminoácidos aromáticos: F,W,Y

Aminoácidos azufrados: C,M

Aminoácidos básicos: K,R,H

Aminoácidos ácidos: B,D,E,N,Q,Z

Aminoácidos alifáticos hidroxilados: S,T

El valor GRAVY (grand average of hydropathy) es calculado sumando el valor de hidropatía de cada residuo y dividiendo por la longitud de la secuencia (Kyte y Doolittle, 1982).

### 1.C.2. Conformación de los péptidos y propiedades derivadas.

La actividad antioxidante de péptidos esta correlacionada no solamente con las propiedades fisicoquímicas de sus residuos sino también con el entorno en que los mismos se encuentran (Zou y col. 2016; Nwachukwu y Aluko, 2019), siendo entonces conveniente estudiar su estructura tridimensional.

Los métodos de predicción de estructura para proteínas se encuentran ampliamente desarrollados en el área bioinformática. Los péptidos constituyen sistemas favorables para la aplicación de simulaciones de dinámicas moleculares dado que se asemejan a las proteínas en sus características de plegamiento pero con mayor simplicidad. Todos estos métodos y programas, independientemente de la base algorítmica, utilizan campos de fuerza empíricos para refinar las estructuras propuestas. Por lo tanto, es importante cuan buenos son los campos de fuerzas empíricos para describir las estructuras y dinámicas de los péptidos, especialmente de aquellos que no se pliegan de manera estable o tienen más de una conformación estable. Se han desarrollado diversos campos de fuerzas para las simulaciones de macromoléculas biológicas, entre ellos AMBER (Assisted Model Building with Energy Refinement), el cuál fue utilizado en las simulaciones realizadas en este trabajo (Georgoulia y Glykos, 2019).

Partiendo de la secuencia de cada uno de los 10 péptidos se estudiaron sus respectivos espacios conformacionales mediante simulaciones de dinámica molecular de equilibrio tal como se describió en la sección 1.8.2. de Materiales y Métodos. A diferencia de los métodos de simulación *ab-initio*, este tipo de ensayos presentan como fortaleza el hecho de que tienen en cuenta la flexibilidad de los péptidos en un entorno acuoso, más próximo al entorno fisiológico. Los análisis de las trayectorias resultantes incluyeron el control de la temperatura y análisis energéticos y estructurales. La **Figura 1.10.** muestra a manera de ejemplo la variación de energía potencial ( $U$ ) en función del tiempo de la simulación (**Figura 1.10.A**), y las conformaciones finales correspondientes a 5 ns de tiempo de simulación. Estas son presentadas como superficie molecular coloreada de acuerdo al potencial electrostático de los átomos (**Figura 1.10.B**) que permite predecir ubicaciones favorables de átomos eléctricamente positivos (en color azul), neutros y negativos (en color rojo), o como superficie molecular coloreada de acuerdo a la ubicación más probable de grupos hidrofílicos (en rosa en la figura) o lipofílicos (en verde) (**Figura 1.10.C**).

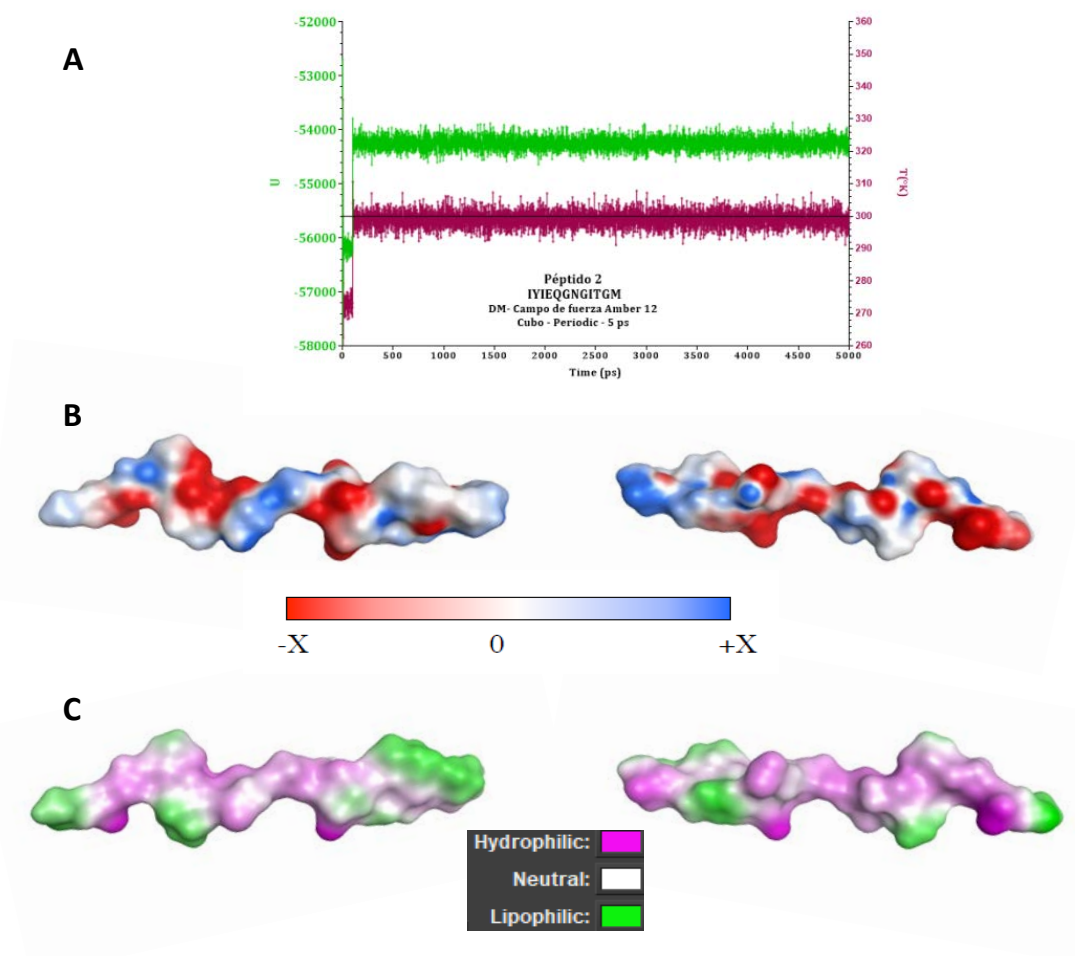


Figura 1.10. Ensayo de dinámica molecular en campo de fuerza AMBER12 de 5 ns en condiciones periódicas de contorno en presencia de  $H_2O$  y NaCl (MOE2015.1). A) Energía potencial ( $U$ ) y temperatura ( $K$ ) en función del tiempo de simulación; B) Conformación peptídica final mostrando la superficie de acuerdo al potencial electrostático de los átomos (2 caras en espejo); C) Conformación peptídica mostrando la superficie de acuerdo a la lipofobicidad de los átomos (2 caras en espejo).

Siguiendo la misma convención de colores, se presentan las conformaciones de los 10 péptidos, mostrando además imágenes especulares a fin de poder evidenciar las dos caras de los mismos (**Figuras 1.11 a 1.20**). En términos generales, puede observarse una mayor presencia de zonas hidrofílicas en todos los péptidos. El péptido 2 presenta la mayor proporción y distribución de zonas hidrofóbicas expuestas en ambas caras y con menor intensidad el péptido 7 y el péptido 5, mientras que otros péptidos presentan zonas hidrofóbicas acotadas pero intensas (péptidos 1, 3, 8, 10) o más débiles (péptidos 4, 6 y 9). Estas visualizaciones presentan una tendencia bastante comparable a la reflejada por el parámetro GRAVY mostrado en el punto anterior.

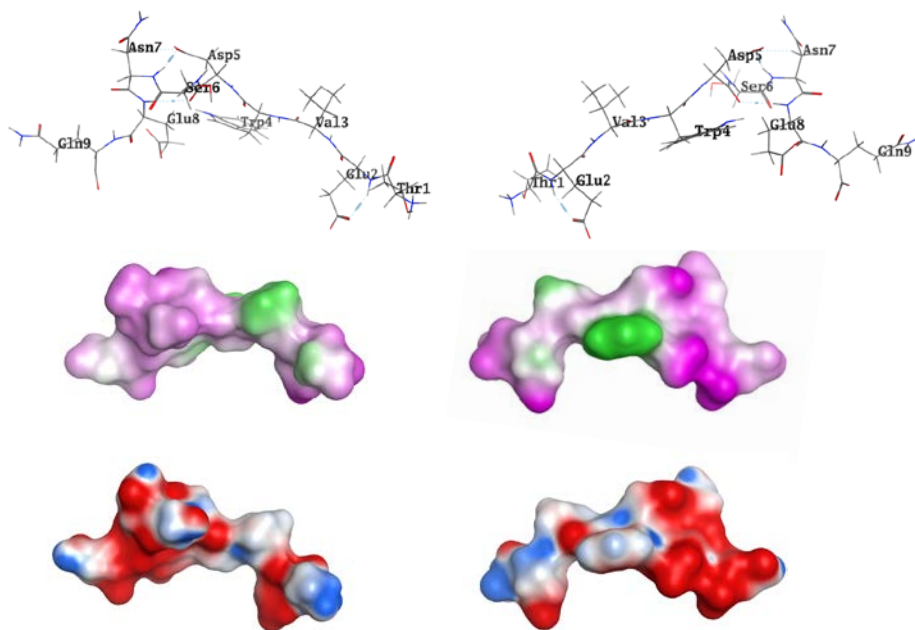


Figura 1.11. Conformación del péptido 1 obtenida por dinámica molecular (MOE2015.1)

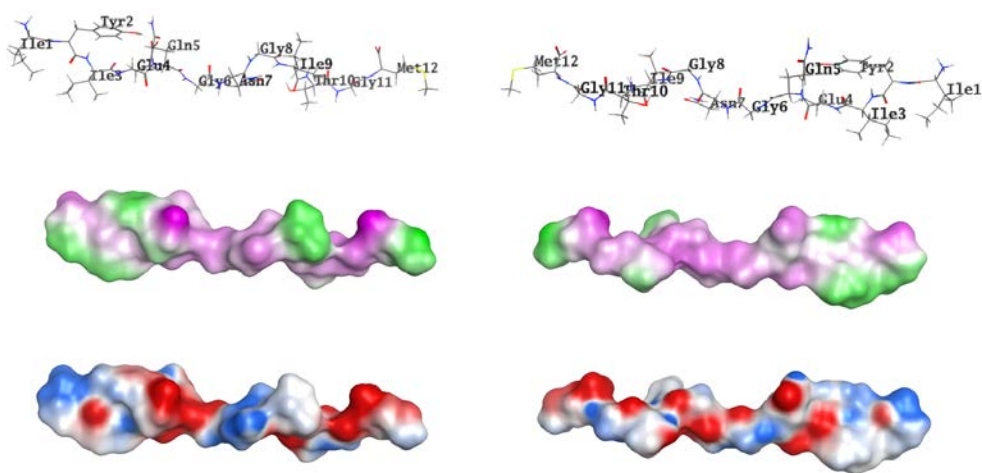


Figura 1.12. Conformación del péptido 2 obtenida por dinámica molecular (MOE2015.1)



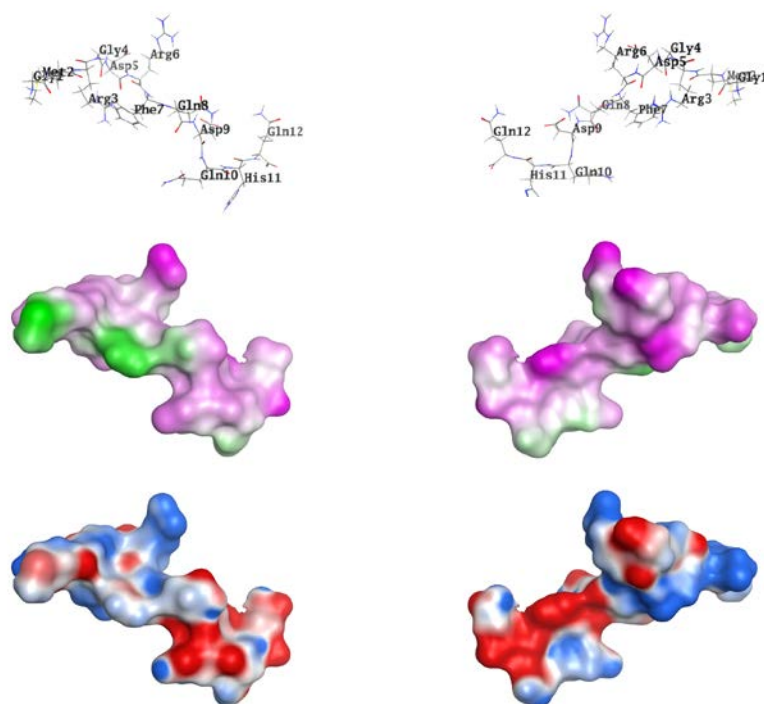


Figura 1.13. Conformación del péptido 3 obtenida por dinámica molecular (MOE2015.1)

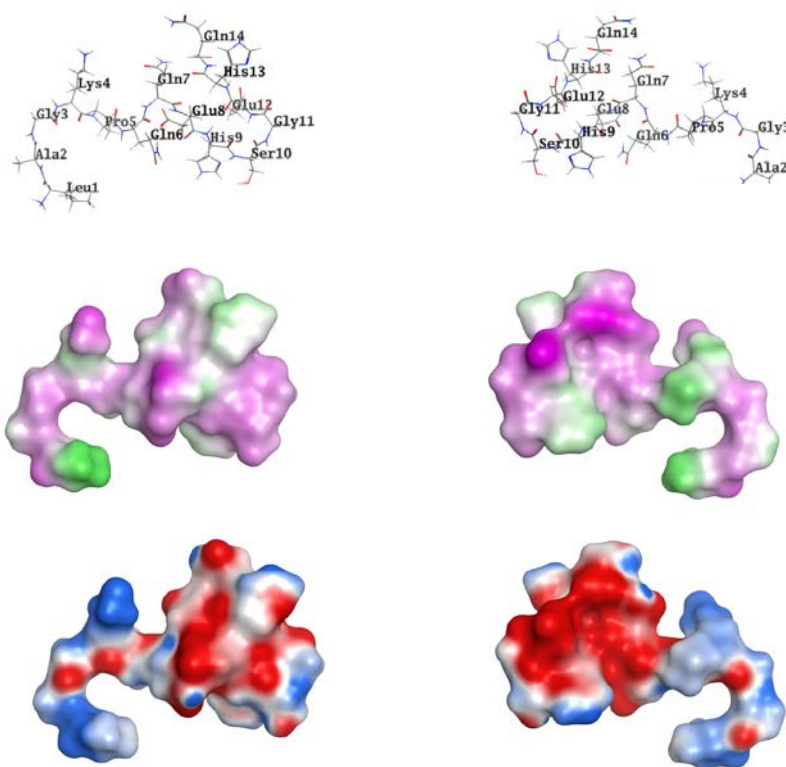


Figura 1.14. Conformación del péptido 4 obtenida por dinámica molecular (MOE2015.1)



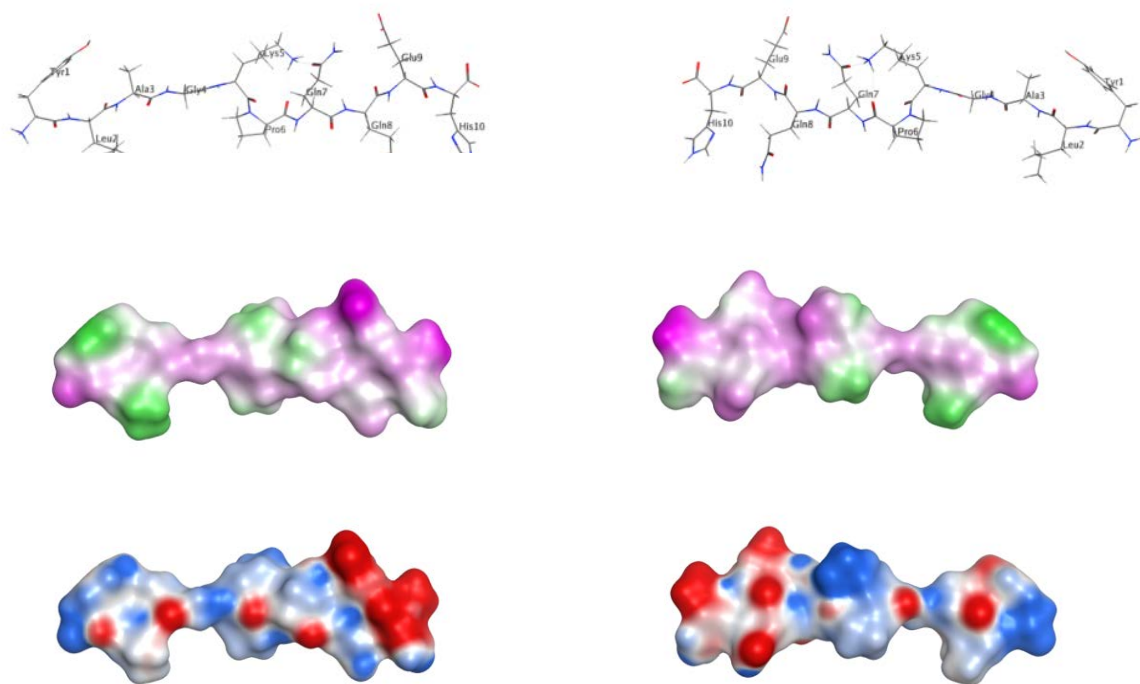


Figura 1.15. Conformación del péptido 5 obtenida por dinámica molecular (MOE2015.1)

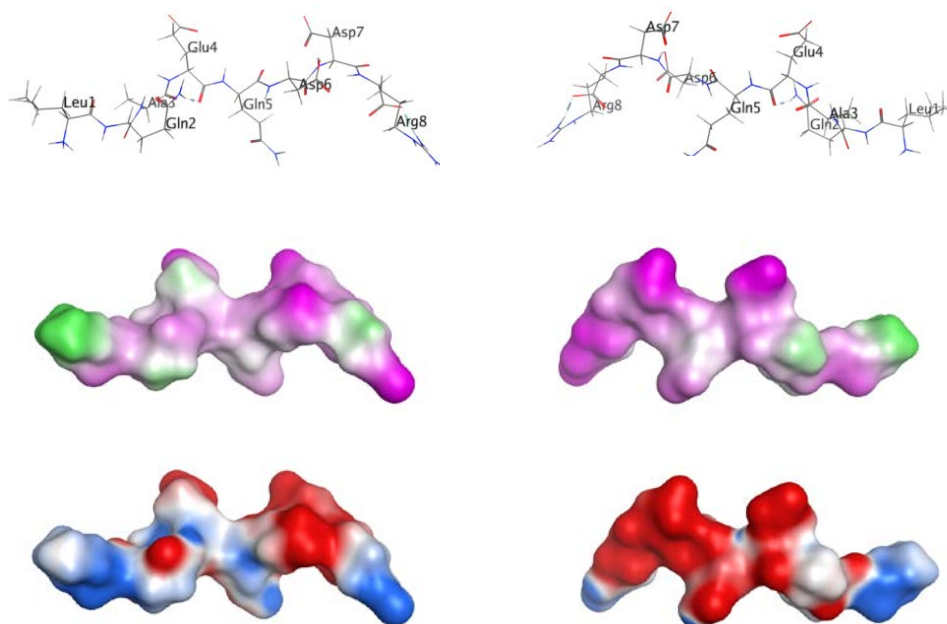


Figura 1.16. Conformación del péptido 6 obtenida por dinámica molecular (MOE2015.1)

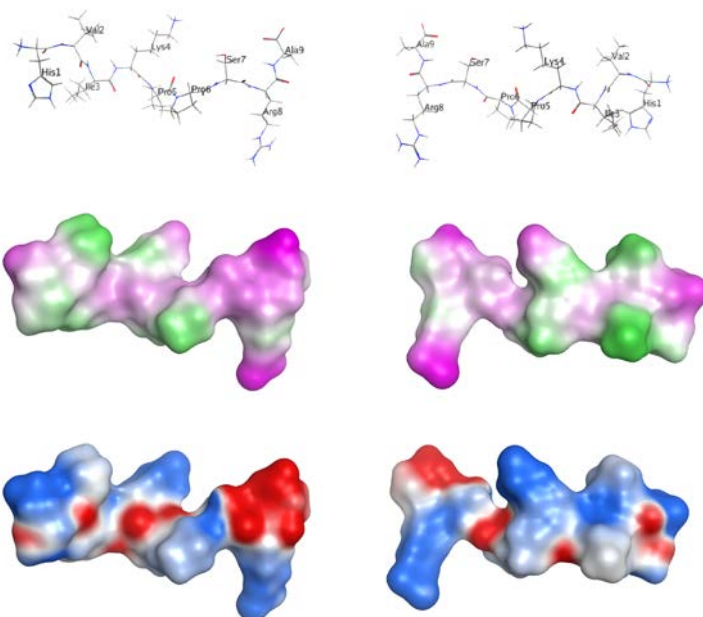


Figura 1.17. Conformación del péptido 7 obtenida por dinámica molecular (MOE2015.1)

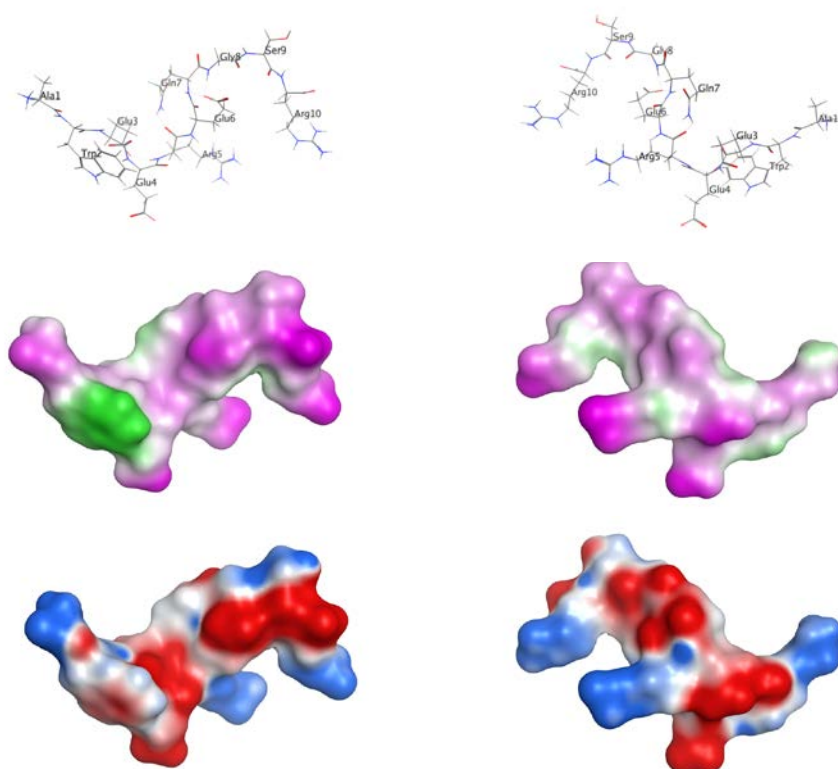


Figura 1.18. Conformación del péptido 8 obtenida por dinámica molecular (MOE2015.1)

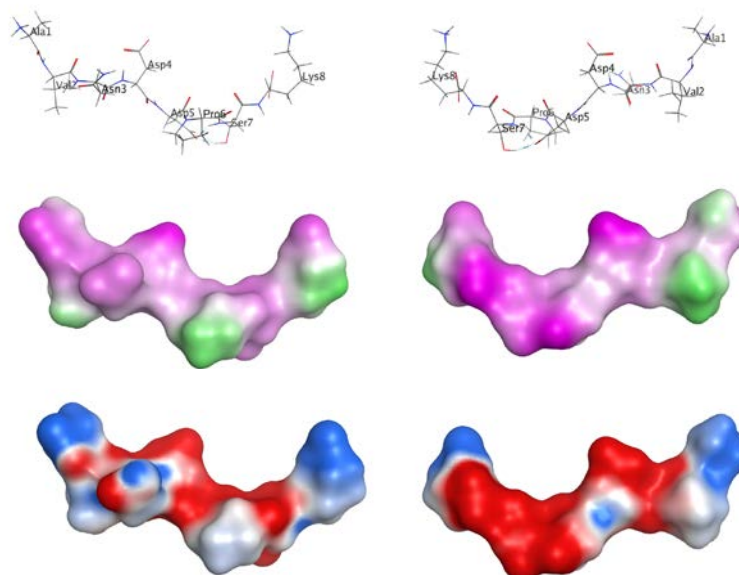


Figura 1.19. Conformación del péptido 9 obtenida por dinámica molecular (MOE2015.1)

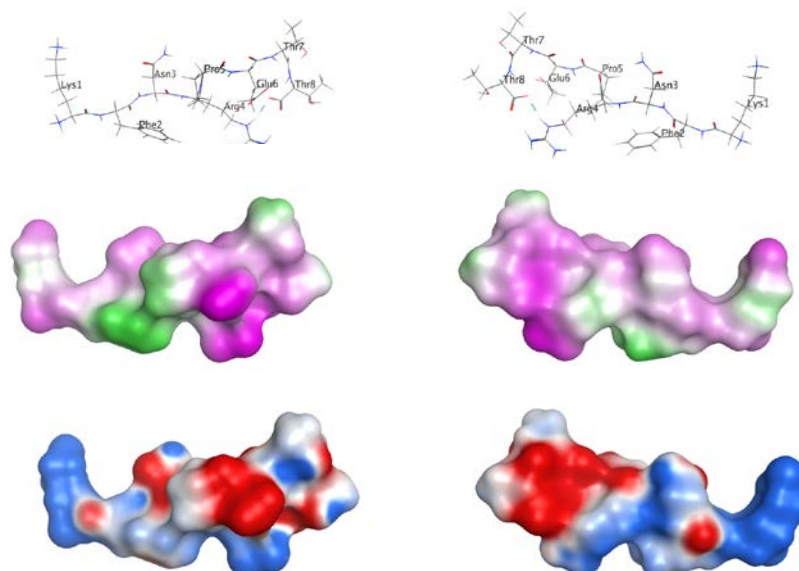


Figura 1.20. Conformación del péptido 10 obtenida por dinámica molecular (MOE2015.1)

Para analizar la relación estructura-actividad entre el carácter/poder antioxidante de este conjunto de péptidos y las propiedades fisicoquímicas asociadas a su estructura, se calcularon diferentes descriptores moleculares empleando el software MOE. Un descriptor molecular es el resultado final de un procedimiento lógico y matemático el cual transforma la información química codificada dentro de una representación simbólica de una molécula en un número útil o el resultado de algún experimento estandarizado. En bibliografía se encuentra una gran numero de descriptores, pero todos ellos describen solamente tres aspectos fundamentales de una moléculas: sus propiedades hidrofóbicas, electrónicas y estéricas (Aranda, 2018). Para este trabajo se decidió obtener los parámetros dependientes de las coordenadas internas de la estructura (descriptores del tipo i3D): *volumen*, *área superficial accesible al solvente (agua) (ASA)*, *área superficial accesible de todos*

los átomos con carga positiva (estrictamente  $> 0$ ) (ASA+), área superficial accesible de todos los átomos con carga negativa (estrictamente  $< 0$ ) (ASA-), área superficial accesible de los átomos hidrofóbicos ( $q_i < 0,2$ ) (ASA\_H), y el área superficial accesible de los átomos polares ( $q_i \geq 0,2$ ) (ASA\_P);  $q_i$  = carga parcial de los átomos. Estos descriptores dependen de las cargas parciales de las moléculas y de sus conformaciones. El área superficial accesible (ASA) se ha utilizado exitosamente para estimar las energías de solvatación de pequeñas moléculas y péptidos, y desolvatación durante el plegamiento, desplegamiento y asociación de proteínas (Fleming y col., 2005). Se refiere al área de la superficie que es accesible al agua; en este caso se usó un radio de 1,4 Å para la molécula de agua y una representación poliédrica de cada átomo en el cálculo de la misma. El cálculo de ASA asume que la totalidad de la superficie en cuestión está disponible simultáneamente para la solvatación, sin distinción entre distintos sitios accesibles. Esta es una premisa pobre para una molécula químicamente heterogénea como un péptido, que presenta sitios polares y apolares muy próximos. Dado que las interacciones entre el agua y sitios polares son mucho más fuertes que las interacciones entre el agua y sitios no polares, la solvatación de grupos NH y CO está favorecida sobre los grupos apolares, siendo los tiempos de residencia de las moléculas de agua sobre los sitios polares tres veces mayores que sobre los apolares; por esto la solvatación apolar dependerá frecuentemente de la solvatación polar previa. Esto es, una molécula de agua unida por puente de hidrógeno a un sitio polar puede inhibir el acercamiento de otras moléculas de agua a sitios apolares vecinos. En la práctica, esto puede ser aproximado pre-solvatando los sitios polares; el cálculo de un ASA hidrofóbica bajo esta condición previa provee un método para diferenciar entre distintos ambientes de solvatación (Fleming y col., 2005). Los valores obtenidos para los péptidos y discriminados según los entornos de solvatación se muestran en la **Tabla 1.10**. Los péptidos 2, 3 y 4 presentaron las mayores áreas superficiales accesibles totales (ASA). Observando la distribución entre el área accesible hidrofóbica (ASA\_H) y el área accesible polar (ASA\_P) puede mencionarse que para los péptidos 1, 3, 4, 5, 6, 8, 9 y 10 ASA\_P fue mayor que ASA\_H, siendo P8 el que muestra la mayor diferencia y P4 y P10 diferencias pequeñas. Por otra parte, los péptidos 2 y 7 presentaron el comportamiento inverso (ASA\_H mayor que ASA\_P), indicando una mayor proporción de superficie hidrofóbica expuesta para estos péptidos. Respecto a las áreas superficiales accesibles respecto a las cargas de los átomos, el péptido 7 muestra una fuerte preponderancia de ASA+, este parámetro también es mayor que ASA- para los péptidos 2, 3, 4, 6, 8, 9 y 10, mientras que ASA- es mayor en el caso de P5 y los dos parámetros son similares para P1.

Los resultados aquí descriptos constituyen una primera aproximación a un modelo de relación estructura-actividad (SAR). Uno de los objetivos futuros es construir un modelo QSAR predictivo que correlacione la actividad antioxidante de este conjunto de péptidos medida por las diferentes metodologías empleadas en esta Tesis, con los descriptores asociados a las propiedades electroestáticas; sin embargo, la rigurosidad del cálculo de los mismos así como la interpretación

de los resultados exceden los objetivos de este trabajo de Tesis y serán abordados en trabajos posteriores en colaboración con químicos computacionales.

Tabla 1.10. Descriptores obtenidos in silico a partir de las conformaciones peptídicas

Péptido	Volumen (Å <sup>3</sup> )	Área superficial accesible (Å <sup>2</sup> )				
		ASA	ASA+	ASA-	ASA_H	ASA_P
1	968,8	1.440,6	730,4	710,1	650,4	790,1
2	1194,5	1.755,8	1.066,7	689,1	946,3	809,5
3	1325,3	1.872,8	1.200,6	672,2	876,7	996,1
4	1389,1	1.926,8	1.257,2	669,6	942,5	984,3
5	1087,1	1.560,0	858,8	1.039,9	560,0	741,1
6	855,6	1.346,4	732,3	614,1	560,1	786,3
7	961,5	1.504,5	1.145,1	359,4	847,3	657,2
8	1109,3	1.591,0	948,7	642,3	605,5	985,5
9	748,6	1.201,0	743,9	457,2	563,7	637,3
10	920,9	1.299,5	882,6	416,9	630,9	668,6

obtenidos en [http://www.chemcomp.com/MOEMolecular\\_Operating\\_Environment.htm](http://www.chemcomp.com/MOEMolecular_Operating_Environment.htm)

ASA = área superficial accesible a agua

ASA+ = área superficial accesible de los átomos con carga positiva (estrictamente > 0)

ASA- = área superficial accesible de los átomos con carga negativa (estrictamente ≤ 0)

ASA\_H = área superficial accesible de los átomos hidrofóbicos ( $q_i > 0,2$ )

ASA\_P = área superficial accesible de los átomos polares ( $q_i \leq 0,2$ )

$q_i$  = carga parcial de los átomos

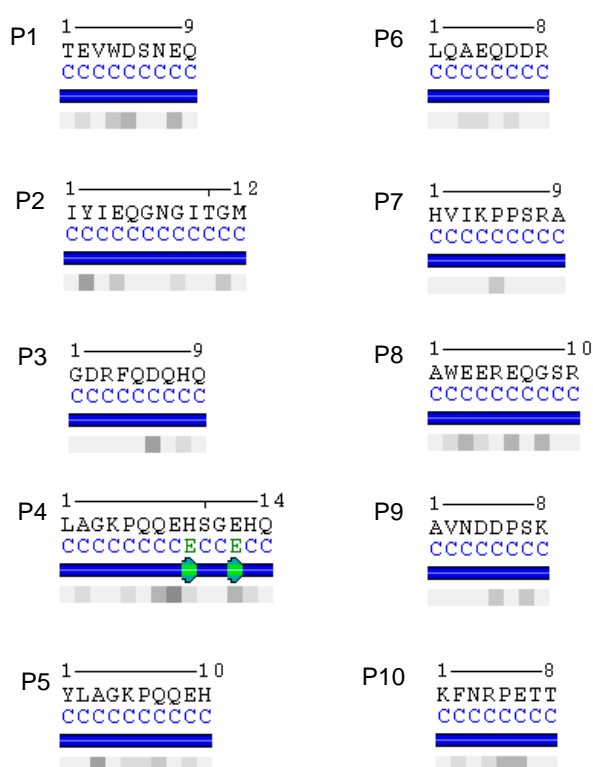


Figura 1.21. Estructura secundaria de las conformaciones peptídicas obtenidas por dinámica molecular. C(azul)=coil, E(verde)= giro  $\beta$  o puente. Se muestra en escala de grises la accesibilidad relativa al solvente (RSA): negro=0-9 % RSA, blanco=90-100 % RSA (<http://polyview.cchmc.org/>).

Se analizó la estructura secundaria de las conformaciones finales obtenidas en los ensayos de dinámica molecular utilizando el servidor Polyview-2D (<http://polyview.cchmc.org/>). Todos los péptidos presentaron conformaciones desordenadas (coil), solo en el caso del péptido 4 aparece una estructura de giro  $\beta$  entre un residuo histidina y un ácido glutámico (**Figura 1.21**). En esta figura también se muestra el grado de exposición de cada aminoácido al solvente, lo cuál podría ser útil para ayudar a explicar los comportamientos antioxidantes de los péptidos.

### 1.C.3. Propiedades relacionadas con la interacción de los péptidos con células

Dado que uno de los focos más importantes de esta Tesis es la actividad antioxidante a nivel celular, se realizó una primera aproximación al análisis de propiedades de los péptidos que están relacionadas con la potencial interacción entre los péptidos y una célula. Por una parte, se utilizó un software predictor de la toxicidad peptídica (ToxinPred) basado en un modelo desarrollado por Gupta y col. (2013). Este modelo está basado en una importante cantidad de péptidos tóxicos colectados de varias bases de datos y utiliza la herramienta *machine-learning technique support vector machine* (SVM) para discriminar péptidos tóxicos de no tóxicos. Estos autores observaron la presencia de varios motivos en los péptidos tóxicos y que ciertos residuos como cisteína, histidina, asparagina y prolina son abundantes y preferidos en ciertas posiciones. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 1.11**; según esta predicción, ninguno de nuestros péptidos en estudio sería tóxico.

*Tabla 1.11. Predicción de parámetros relacionados con la interacción péptido-célula*

Péptido	Toxicidad <sup>1</sup>		Penetración celular <sup>2</sup>
	score SVM	Predicción	CPPred
1	-1,19	no tóxico	0,08
2	-1,48	no tóxico	0,06
3	-1,21	no tóxico	0,09
4	-0,84	no tóxico	0,12
5	-1,08	no tóxico	0,15
6	-1,28	no tóxico	0,17
7	-0,77	no tóxico	0,22
8	-0,73	no tóxico	0,24
9	-0,93	no tóxico	0,12
10	-0,61	no tóxico	0,29

<sup>1</sup>obtenido en <http://crdd.osdd.net/raghava/toxinpred/index.html>

<sup>2</sup>obtenido en <http://distilldeep.ucd.ie/CPPpred/>

Se analizó además un parámetro relacionado con la capacidad de penetración celular de los péptidos (CCPred score). CPPred predice la probabilidad de que cada uno de los péptidos de una lista ingresada pueda penetrar una célula. Es importante tener en cuenta que el servidor predice la probabilidad de que el péptido penetre las células y no predice el grado de eficiencia de captación. Cuando el score es mayor a 0,5, el péptido es considerado con capacidad de penetrar



células, aunque se ha registrado un % considerable de falsos positivos tomando este valor (Holton y col., 2013). En la **Tabla 1.11** se presentan los scores CCPred obtenidos. Como puede observarse ninguno de los péptidos presentó valores indicativos de una alta probabilidad de penetración. Los péptidos 1, 2 y 3 presentaron scores muy cercanos a 0 indicando que es muy poco probable que puedan penetrar una célula. Los péptidos 4, 5, 6 y 9 mostraron valores intermedios dentro de la presente lista, mientras que los péptidos 7, 8 y 10 registraron los scores más altos por lo que tendrían las mayores probabilidades de penetración celular. En general, se considera que los péptidos capaces de penetrar células se caracterizan por tener longitudes entre 5 y 30 aminoácidos, son ricos en aminoácidos básicos que les otorgan cargas netas positivas y tienen zonas hidrofóbicas (Holton y col., 2013). En nuestro caso, los péptidos 7 y 10 presentan carga neta positiva (**Tabla 1.9**), y en los tres (7, 8 y 10) se observan algunas zonas de carácter hidrofóbico en las conformaciones simuladas (**Figuras 1.17, 1.18 y 1.20**).

#### 1.C.4. Actividad de los péptidos frente a radicales libres in sistemas químicos.

Estas secuencias peptídicas habían sido seleccionadas en base a relaciones estructura-función (modelo QSAR) para la actividad en el ensayo ORAC. Sin embargo, cuando los 10 péptidos fueron evaluados mediante dicho ensayo, se registraron diversos comportamientos (**Tabla 1.12**). El péptido 8, fue el que presentó el mayor potencial antioxidante, seguido de los péptidos 5, 2 y 1 con capacidad antioxidante comparable. El péptido 4, seguido de los péptidos 7 y 3, presentaron capacidades antioxidantes notablemente menores (entre 6 y 90 veces) que el del péptido 8, mientras que los péptidos 6, 9 y 10 no presentaron actividad por este método (Orsini Delgado y col., 2016). Por lo tanto, el orden de actividad para la neutralización del radical peroxilo mediante el ensayo ORAC fue: P8>P5=P2=P1>>P4>P7=P3; P6, P9 y P10 sin actividad.

*Tabla 1.12. Actividad ORAC y HORAC de los péptidos*

Péptido	ORAC IC <sub>50</sub> (mg/mL) <sup>1</sup>	HORAC % inhibición <sup>2</sup>
1	0,020 (0,017-0,023)	56 ± 6
2	0,017 (0,015-0,020)	66 ± 6
3	0,60 (0,49-0,72)	na
4	0,14 (0,12- 0,17)	25 ± 2
5	0,016 (0,013-0,018)	57 ± 2
6	na	23 ±13
7	0,57 (0,50-0,65)	25 ± 5
8	0,0067 (0,0063-0,0073)	79,3 ± 0,3
9	na	15 ± 4
10	na	na

<sup>1</sup>datos tomados de Orsini Delgado y col., 2016. Entre paréntesis se indica el intervalo de 95% de confianza. na: sin actividad para concentraciones hasta 1 mg/mL.

<sup>2</sup>determinaciones realizadas para c = 0,2 mg/mL. na: sin actividad

A fin de aportar más información de estas secuencias respecto a su actividad en la neutralización de radicales libres en sistemas acelulares, se evaluaron mediante el ensayo HORAC que refleja principalmente la actividad de quelación de metales inhibiendo la formación de radicales OH<sup>•</sup>. En la **Tabla 1.12** se muestra el % de inhibición de radicales OH<sup>•</sup> correspondientes a soluciones (0,2 mg/mL) para los diez péptidos sintéticos.

Podemos observar que los péptidos 8, 5, 2 y 1 presentaron alta actividad en el ensayo HORAC. Estos mismos péptidos son los que también registraron las mayores capacidades en el ensayo ORAC. Por otro lado, los péptidos 4, 6 y 7 presentaron actividad intermedia en el ensayo HORAC; sin embargo, el péptido 6 no había presentado actividad y el 7 fue de los menos activos en el ensayo ORAC. Finalmente, los péptidos 3, 9 y 10 presentaron muy baja o nula actividad en el ensayo HORAC con resultados similares en el ensayo ORAC. El orden de actividad para el ensayo HORAC fue: P8>P2>P5=P1>P4=P7=P6>P9; P3 y P10 sin actividad. Puede marcarse también que en este caso, los valores de % de inhibición presentados por los péptidos más activos fueron significativamente mayores a los registrados por cualquiera de las fracciones FPLC, incluso aquellas que contenían moléculas en el rango de masas moleculares de estos péptidos en concentraciones similares o algo mayores a 0,2 mg/mL (fracciones 21 a 25, ver **Tabla 1.7** y **Figura 1.9**). Esto sugiere una potencia mayor de estos péptidos individuales respecto al conjunto de moléculas presente en cada fracción FPLC.

Analizando estos resultados puede remarcarse, en primer término, que el hecho de que ninguno de los péptidos tenga una conformación con estructura ordenada o plegamientos, nos sugiere que es favorable para que los residuos aminoacídicos puedan interactuar con otras sustancias (radicales libres, metales, etc). Si bien los ensayos ORAC y HORAC no presentaron resultados completamente comparables, pueden observarse algunos comportamientos similares. Los péptidos más activos (4 péptidos) fueron los mismos por ambos métodos. Dentro del grupo de los menos activos o sin actividad (6 péptidos), se detectaron diferencias en el comportamiento de tres de las secuencias. Los péptidos con mayor actividad por ambos métodos (P8, P5, P2, y P1) tienen carga negativa o cercana a la neutralidad, los 4 pertenecen a la subunidad ácida de la globulina 11 S (**Tablas 1.8** y **1.9**). Dos de ellos (P8 y P1) presentan una proporción mayoritaria de aminoácidos ácidos, mientras que P5 y P2 tienen a los aminoácidos hidrofóbicos en mayor proporción. P2 es el único de los 4 péptidos que presentó carácter hidrofóbico de acuerdo con el parámetro GRAVY y las visualizaciones de la conformación peptídica obtenida por dinámica molecular, con mayor proporción de área superficial hidrofóbica expuesta al solvente (**Tabla 1.10**). P1, P2 y P5 presentaron carácter hidrofílico con mayor proporción de área superficial polar expuesta (**Tablas 1.9** y **1.10**, **Figura 1.12**).

Como ya se ha mencionado, la capacidad de inhibición de radicales libres de los hidrolizados proteicos es influenciada por propiedades estructurales tales como composición de aminoácidos, tamaño o masa molecular (Ketnawa y col., 2018). Hernández-Ledesma y col. (2005) evaluaron la actividad antioxidante por ORAC de cada aminoácido libre, demostrando que Trp, Tyr y Met



presentaban las mayores actividades, seguidos de Cys, His y Phe, mientras que el resto de los aminoácidos no presentaron actividad ORAC. La elevada actividad que presentaron el Trp y la Tyr podría explicarse por su capacidad para donar un átomo de hidrógeno; mientras que la Met podría ser oxidada a sulfóxido de metionina y la Cys podría donar el átomo de hidrógeno del grupo sulfhidrilo. Luego de la evaluación de la actividad de diferentes péptidos, dichos autores concluyeron que la composición peptídica podría influir tanto de manera sinérgica como antagónica en comparación con la actividad antioxidante de los aminoácidos libres. En otro trabajo, se evaluaron diversos péptidos de la  $\beta$ -lactoglobulina, también a través del ensayo ORAC, encontrando una elevada actividad en aquellos péptidos que tenían residuos de Trp, Tyr y Met (Hernández-Ledesma y col., 2007). Digeridos (por pepsina y pancreatina) de garbanzo conteniendo alta cantidad de aminoácidos hidrofóbicos tales como poseen fuertes propiedades de neutralización de radicales libres (Torres-Fuentes y col., 2015). Hidrolizados proteicos conteniendo aminoácidos ácidos negativamente cargados (Glu y Asp) pueden actuar neutralizando radicales libres o reduciendo cationes metálicos dado que los electrones en exceso que contienen son fácilmente donados por estos aminoácidos (Aluko, 2012; He y col., 2012; Zou y col., 2016). Hidrolizados proteicos y péptidos conteniendo alta proporción de Ala, Leu, Pro, aminoácidos aromáticos (Trp (W), Phe (F), Tyr (Y)) e His (H) han sido relacionados con alta capacidad de neutralización de radicales libres a través de transferencia directa de electrones (Ketnawa y col., 2018). En el caso de His, que presenta además capacidad quelante, su actividad está dada por el anillo imidazol. Las cadenas laterales aromáticas pueden participar tanto en reacciones de transferencia de electrones como de transferencia de un átomo de hidrógeno (HAT) (Aluko, 2012; Lin y col., 2014; Udenigwe y Aluko, 2011). Algunos estudios sugieren que las contribuciones individuales de aminoácidos dentro de una secuencia pueden ser más importantes que los efectos aditivos de los aminoácidos. Además de la longitud de la cadena y la composición y secuencia de aminoácidos, la localización de aminoácidos específicos en la cadena puede ser crítica en sus propiedades antioxidantes (Gallego y col., 2018). Por ejemplo, se ha postulado que el grupo carboxilo de Glu (E) al lado de la Tyr (Y) en el octapéptido AEEEYPDL puede inducir la donación de un átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo fenólico de Tyr (Gallego y col., 2018). Se han correlacionado las propiedades estéricas, de formación de puentes de H, electrónicas e hidrofóbicas de los aminoácidos C- y N-terminales con la capacidad antioxidante. Hernández-Ledesma y col. (2007) demostraron que la presencia de Tyr y Met en el extremo C-terminal, así como la presencia de Trp y Tyr en el extremo N-terminal aumentarían la capacidad antioxidante de los péptidos. En otros estudios ya se había demostrado que la presencia de Tyr en el extremo N-terminal sería uno de los factores determinantes en la actividad antioxidante de péptidos derivados de la ovoalbúmina (Dávalos y col., 2004). Se ha informado buena actividad antioxidante en secuencias que contienen Pro (P), His (H) o Tyr (Y) y aminoácidos hidrofóbicos como Val (V) o Leu (L) en el extremo N-terminal. La Pro tiende a interrumpir y cambiar la estructura secundaria del péptido, lo cual podría aumentar la disponibilidad de los residuos aminoacídicos para actuar

como antioxidantes (Farvin y col., 2010). Leu (L) y los motivos Ser-Leu (S-L) o Thr-Leu (T-L) o Pro-Leu (P-L) en las secuencias, particularmente en los extremos N- y C-terminales, han demostrado contribuir a una mayor actividad de neutralización (scavenging) (Ren y col., 2008). Según resultados obtenidos por Li y Li (2013), la localización de aminoácidos voluminosos hidrofóbicos en la región del extremo C-terminal estuvo relacionada con un aumento de la actividad antioxidante por varias metodologías. En el caso de ORAC, además, aminoácidos polares o cargados en el C-terminal así como residuos con bajas propiedades electrónicas en las posiciones 1 y 2 del N-terminal, también contribuyeron con el aumento de la actividad. En nuestro caso, los 4 péptidos más activos (P8, P5, P2 y P1) presentan algún aminoácido aromático (Trp o Tyr) en su secuencia y también al menos un aminoácido ácido (Glu o Asp). Otras características que podrán relacionarse con su actividad son: para P8: presencia de un aminoácido cargado (Lys) en C1, Pro, y Val en la segunda posición N-terminal; P5: His en C-terminal, Leu en la segunda posición N-terminal; P2: Thr (voluminoso) en la tercera posición C-terminal, Met en C-terminal, I en N-terminal; P1: presencia de un aminoácido cargado (Gln) en C-terminal.

Con respecto a la actividad quelante de metales, se demostró la importancia de la presencia de residuos de Glu, Asp, His y Lys en fracciones ultrafiltradas de proteína de salvado de arroz (Phongthai y col., 2018); la presencia de Glu también fue relevante en el caso de digeridos pépticos de hojas de mora (Sun y col., 2018) y pescado (Lin y col., 2014). En los últimos, también se demostró mayor actividad quelante a mayor nivel de His. Como se dijo anteriormente, los 4 péptidos más activos presentaron Glu; además P1 contiene Asp y P5 contiene Lys e His. También, para péptidos derivados de arveja se informó que la hidrofobicidad ayudó a incrementar esta actividad (Pownall y col., 2010). Otro estudio demostró un aumento de la actividad quelante dada por la presencia de un residuo Gln en el extremo N-terminal; dado que Gln contiene un grupo carbamilo ( $-\text{CONH}_2$ ) en su estructura, el grupo carbonilo ( $\text{CO}-$ ) es capaz de funcionar como un ligando facilitando la formación de un complejo estable con el ión metálico (Egusa Saiga y Nishimura, 2013).

## CONCLUSIÓN

Esta tesis fue planteada con el objetivo para profundizar el estudio de la actividad antioxidante de péptidos derivados de la digestión gastrointestinal de proteínas de amaranto, iniciado anteriormente utilizando un digerido obtenido mediante un método estático de digestión gastrointestinal *in vitro* optimizado para aislado proteico y, por lo tanto, focalizado en la digestión de proteínas. Por lo tanto, fue de nuestro interés evaluar cuan alejado se encontraba nuestro digerido de lo que serían los productos de la digestión *in vivo* de aislado proteico de amaranto.

*Se comparó nuestro digerido con el obtenido aplicando un método estático de digestión gastrointestinal in vitro internacionalmente consensuado, que aplica condiciones que se asemejan más a lo que ocurre in vivo. Los resultados indicaron que, si bien las condiciones de digestión de los distintos protocolos fueron bastante diferentes (tanto en la composición y pH de los fluidos como en las actividades enzimáticas y tiempos de incubación), el grado de hidrólisis global obtenido fue similar y la composición de los digeridos presentó solo algunas diferencias en la cantidad relativa de los distintos constituyentes. La actividad antioxidante ORAC y HORAC de los digeridos fue similar y las fracciones más activas en cada caso también fueron comparables. Por lo tanto, puede concluirse que el digerido obtenido con el método de digestión de nuestro laboratorio, y que será el utilizado en el resto de la Tesis, presenta una importante similitud con el obtenido por el método de digestión internacionalmente consensuado.*

*A partir de dicho digerido, se obtuvieron fracciones separadas de acuerdo a su masa molecular, las cuales fueron caracterizadas en lo que respecta a masas moleculares, concentración peptídica y actividades ORAC y HORAC. Las fracciones más abundantes generadas por digestión gastrointestinal correspondieron a masas moleculares en el rango de 0,6 a 2,4 kDa y de 0,2 a 0,3 kDa. La actividad ORAC fue importante en todo el rango de masas moleculares evaluado, es decir desde péptidos mayores a 10 kDa a moléculas con masas moleculares en el orden de los aminoácidos libres, mientras que la HORAC fue muy baja para todas las fracciones debido a la concentración peptídica requerida por este método.*

*Se realizaron estudios in silico donde se evaluaron características fisicoquímicas, estructuras y de interacción con células de diez péptidos sintéticos derivados de la digestión gastrointestinal de aislado proteico de amaranto. También se evaluaron las actividades ORAC y HORAC de los péptidos, las cuales presentaron una correlación importante.*

*Los resultados presentados en este Capítulo servirán como base para el estudio de la actividad antioxidante de productos de la digestión gastrointestinal de aislado de amaranto en sistemas in*

*vitro* más complejos tales como lipoproteínas de baja densidad (LDL) y cultivos celulares y el análisis de posibles mecanismos de acción.

**CAPÍTULO 2.**

**PREVENCIÓN DE LA OXIDACIÓN DE  
LIPOPROTEÍNAS DE BAJA DENSIDAD (LDL)**

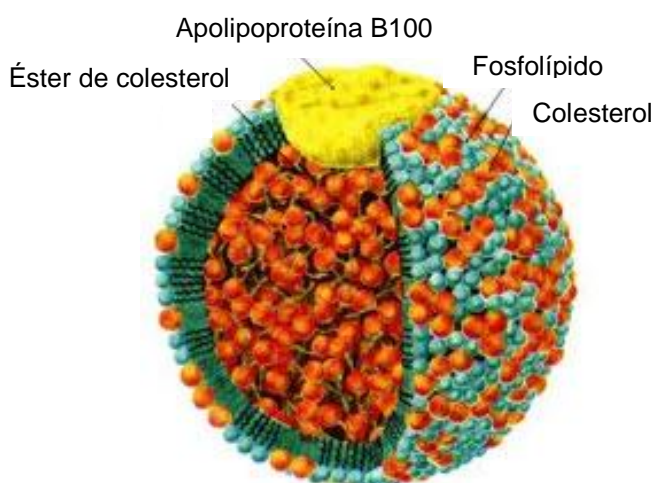
## INTRODUCCIÓN

### Lipoproteínas de baja densidad (LDL), oxidación y formación de la placa aterogénica

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) las enfermedades cardiovasculares (ECV) constituyen la principal causa de muerte en todo el mundo siendo el desarrollo de la aterosclerosis el verdadero problema subyacente. Entre las enfermedades más letales en la actualidad se encuentran la cardiopatía coronaria, la enfermedad cerebrovascular y vasculopatía periférica (OMS, 2008).

La aterosclerosis es una alteración crónica y progresiva que responde a daños multifactoriales de la pared de los vasos sanguíneos. Estos daños promueven la formación de placas ateromatosas y fibróticas, las cuales constituyen regiones engrosadas de la capa íntima de las arterias y están formadas por tejido fibrótico, células inmunocompetentes y del plasma, así como por lípidos. La aterogénesis se inicia con una lesión endotelial que facilita la fijación de macrófagos a la capa íntima. En determinadas condiciones, los macrófagos degeneran en células espumosas y forman lo que se conoce como *placa joven*; esta lesión temprana de la aterosclerosis se describe también como *estría grasa* y se ve como manchas amarillas en la superficie de la íntima de las arterias y es apreciable desde la adolescencia. Estos macrófagos pueden inducir la proliferación de células musculares lisas que a su vez favorecen la acumulación de más lípidos, colágeno, elastina, etc. y un conjunto de cambios que implican mecanismos de inflamación, reparación celular y coagulación, que dan lugar a la *placa fibrosa o adulta* (Fuentes Arderiu y col., 1998).

Las lipoproteínas de baja densidad (LDL) son partículas muy ricas en colesterol y ésteres de colesterol y contienen la apo-B100 como principal apoproteína (**Esquema 2.1**).

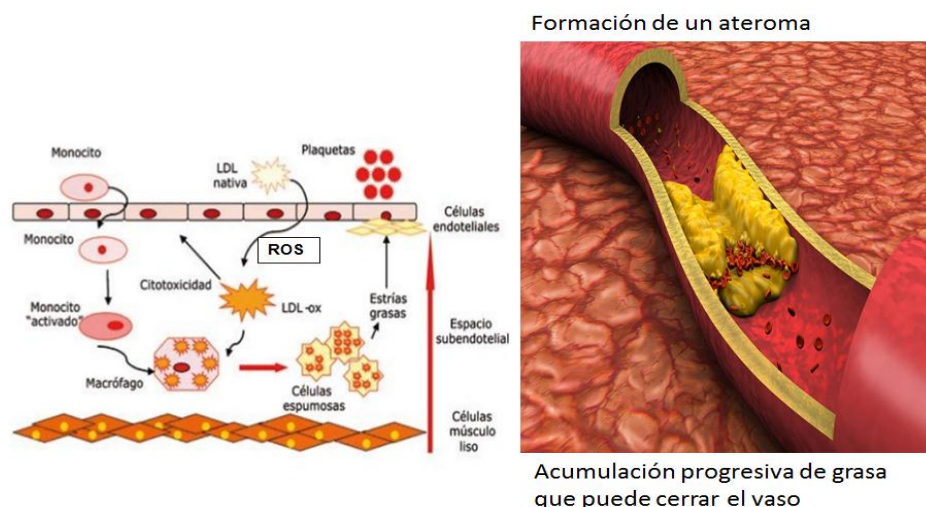


*Esquema 2.1. Estructura de la LDL*

La oxidación de las LDL en la pared arterial es crucial en las primeras etapas del desarrollo de la placa aterogénica debido a las características especiales de la LDL oxidada (LDLox). En nuestro

organismo, las partículas de LDL constituyen la vía de transporte de colesterol a las células periféricas. Esta vía de incorporación del colesterol está mediada por receptores y ocurre de forma regulada y saturable. El proceso se lleva a cabo mediante la formación e internalización del complejo LDL-receptor: las células periféricas que tienen receptores de apolipoproteína B (apo-B) y las células del hígado que tienen receptores para la apo-B y la apo-E identifican a la apo-B100 presente en las LDL, se forma el complejo y éste se internaliza en la célula por endocitosis, finalmente el colesterol es liberado del complejo. Dicho proceso de incorporación de colesterol se encuentra regulado: el aumento de colesterol libre intracelular determina la inhibición de la síntesis de los receptores de las LDL y la activación de la enzima colesterol-O-aciltransferasa (ACAT) encargada de esterificar al colesterol; en las células capaces de sintetizar colesterol, como las células hepáticas, se produce la inhibición de la enzima hidroximetilglutaril-CoA-reductasa (HMGCoAR), fundamental en dicha síntesis.

Los macrófagos, por su parte, poseen una vía de incorporación de colesterol que no está mediada por receptores de apo-B100 y que tampoco está controlada por la cantidad intracelular de colesterol. Aproximadamente entre el 20 y 30 % de las LDL son captadas por esta vía que está mediada por receptores inespecíficos (Scavenger Receptor: SR-A), capaces de reconocer a las LDL que han sufrido alguna modificación electrostática, principalmente por oxidación. La modificación oxidativa de las LDL resulta entonces en una acumulación anómala de colesterol por parte de los macrófagos que degeneran y se convierten en las llamadas células espumosas típicas de las estrías grasas observadas en las lesiones ateroscleróticas (Delgado-Roche y Martínez-Sánchez, 2010). Por la tanto, la principal propiedad de la LDL oxidada (LDLox) que la hace más aterogénica que la LDL nativa (LDLnat) es su capacidad de ser reconocida por este receptor inespecífico lo que finalmente lleva a la formación de las células espumosas (Steinberg, 1997). En el **Esquema 2.2.** se muestra un resumen del proceso de aterogenesis y la participación de las LDL oxidadas.



**Esquema 2.2.** Oxidación de LDL y aterogénesis.

Otras características de las LDLox que también favorecen su potencialidad proaterogénica son:

a) Es, en sí misma, un quimioattractante para los monocitos (Steinberg, 1997). Su actividad quimioatrayente reside en su fracción lipídica, y es atribuible a la generación de lisofosfatidilcolina durante la conversión de LDL en su forma oxidada. A diferencia de la LDLnat, es citotóxica para diversos tipos de células, incluidas las endoteliales: los procesos de apoptosis y necrosis inducidos por las LDLox están potencialmente involucrados en la lesión endotelial, en la formación del núcleo central necrótico-lipídico y en la erosión o ruptura de la placa que puede causar su inestabilidad y desencadenar eventos aterotrombóticos.

b) La LDLox promueve la diferenciación de los monocitos en macrófagos tisulares mediante la liberación de factor estimulante de colonias de macrófagos de las células endoteliales e inhibe la movilidad de los macrófagos tisulares o residentes (Young y McEneny, 2001). La LDLox también estimula la migración y la proliferación de células de músculo liso (SMC) e induce cambios en la matriz extracelular (MEC) por dos mecanismos: por estimulación de la producción de colágeno y por estimulación de la expresión y secreción de metaloproteinasas (MMP) involucradas en la degradación de la MEC, y en la remodelación de la pared vascular involucrada en la progresión de la placa aterosclerótica. Estos efectos de LDLox estarían implicados en la hiperplasia intimal y la formación de placa, que se caracteriza por la migración y la proliferación de SMC y miofibroblastos y producción de colágeno. La proteólisis de la MEC, asociada a la apoptosis/necrosis, puede participar en la inestabilidad de la placa y conducir a los eventos clínicos aterotrombóticos (efecto angiogénico de las LDLox) (Salvayre y col., 2016).

c) Las LDLox contienen una mezcla compleja de productos de peroxidación lipídica con diversos y a veces opuestos efectos biológicos: acción tanto pro como antiinflamatoria, inducción de respuestas autoinmunes, entre otros. La unión de las LDLox a receptores scavenger (LOX-1 y CD36) induce la generación intracelular de ROS y la respuesta proinflamatoria que está mediada por varios factores de transcripción. Esto puede participar en la disfunción endotelial y la progresión de la aterosclerosis. Las ROS intracelulares desempeñan un papel bifásico en la señalización celular: niveles bajos activan varias vías de señalización que conducen a la "activación" celular (por ejemplo, migración celular, proliferación, angiogénesis, respuesta inflamatoria), mientras que niveles altos pueden dañar los componentes celulares y pueden conducir finalmente a la muerte celular. Las ROS también pueden reaccionar con óxido nítrico, convirtiéndolo en peroxinitrito y perdiendo su función vasodilatadora. Además, las moléculas de LDLox desencadenan respuestas autoinmunes, como lo demuestra la presencia de autoanticuerpos dirigidos contra diversos neoepítopes de las LDLox que se detectan en lesiones ateroscleróticas. Algunos autoanticuerpos contra LDLox pueden formar complejos inmunes y desempeñar un papel patogénico en la aterogénesis (Salvayre y col., 2016).



### *Oxidación in vivo de las LDL*

A pesar de la presencia de antioxidantes (proteínas, vitamina C, ácido úrico, etc.) que inhiben la modificación oxidativa inducida por las células, existe evidencia de que las moléculas de LDL se oxidan: 1) la fracción de lipoproteína extraída de las lesiones ateroscleróticas (tanto de conejo como de humano) contiene LDLox, identificada tanto por sus propiedades físicas como por su reconocimiento por los receptores scavenger; 2) ensayos inmunohistoquímicos utilizando anticuerpos generados contra las LDLox demuestran su presencia en las lesiones arteriales pero no en la arteria normal; 3) se ha demostrado la presencia, tanto en animales como en humanos, de los autoanticuerpos que reaccionan con la LDLox; 4) la administración de antioxidantes que pueden prevenir la modificación oxidativa de las LDL ralentiza la progresión de la aterosclerosis en varios modelos animales experimentales (Steinberg, 1997).

Los tipos celulares que están implicados en la lesión aterosclerótica en la que se encuentra LDLox, es decir, los macrófagos, las células endoteliales y las células del músculo liso, parecen ser los más propensos a contribuir a la oxidación de LDL *in vivo*. Distintos estudios aseguran que la oxidación de las LDL no tiene lugar en la circulación debido a la presencia de antioxidantes, pero si ocurre en el espacio subendotelial donde las LDL pueden estar expuestas más frecuentemente a oxidantes derivados de células. Una parte de las partículas de LDL que se encuentran circulando en el plasma es capaz de entrar en el espacio subendotelial. El tránsito bidireccional de LDL a través de este espacio puede también resultar en una pequeña cantidad de LDLox circulante. Durante la oxidación de las LDL tanto los lípidos como la apoB100 sufren modificaciones (Matsuura y col., 2008). La oxidación ocurre en dos etapas: en primer lugar, cuando el daño es más débil, se afecta la parte lipídica de la molécula generando lo que se conoce como LDL mínimamente modificada la cual conserva la afinidad por el receptor de LDL, tiene una pequeña carga negativa, activa la señalización antiapoptótica e induce cambios inflamatorios con aumento de quimiocinas y citoquinas. Con el estado inflamatorio en aumento se generan más citoquinas y una oxidación continua de LDL, lo que lleva a que la región lipídica se oxide aún más y que la fracción proteica también se modifique, generando así lo que se conoce como LDL altamente modificada que no es reconocida por el receptor LDL y si por los receptores scavenger de los macrófagos (Yoshida y Kisugi, 2010).

Entre las vías de oxidación más estudiadas que afectan a las LDL se encuentran las enzimáticas: NADPH oxidasa, mieloperoxidasa, citocromo P450, la cadena de transporte de electrones mitocondrial, xantina oxidasa, ceruloplasmina y lipoxigenasa. Se ha estudiado el mecanismo *in vivo* de la oxidación de las LDL circulantes por peroxidación lipídica enzimática y no enzimática (radicalaria). En este mecanismo desempeñan un papel fundamental las lipoxigenasas muy expresadas en macrófagos; se ha demostrado que las LDL necesitan estar unidas a los receptores “LDL-receptor-related protein” (LRP), antes de ser oxidadas por estas enzimas. Los receptores LRP provocan una transferencia selectiva de ésteres de colesterol de la LDL circulante

hacia la membrana del macrófago por un mecanismo de endocitosis y degradación de la partícula de LDL. Paralelamente a la unión de la LDL al receptor LRP, ocurre un proceso de traslocación de la 12/15-lipoxigenasa presente en el citosol hacia la membrana del macrófago, oxidando a los esteres de colesterol en las posiciones 12/15 y quedando la LDL mínimamente oxidada, la cual estará expuesta al ataque radicalario para convertirse después en LDL altamente oxidada (Perez Guerra., 2007). Estudios basados en productos de reacción específicos sugieren que pueden predominar diferentes mecanismos de oxidación de LDL en diferentes etapas del desarrollo de la placa. La oxidación mediada por metales de transición parece ocurrir solo en lesiones avanzadas, mientras que la oxidación mediada por mieloperoxidasa o especies reactivas de nitrógeno ocurre a lo largo del desarrollo de la placa.

La oxidación de las LDL depende de la presencia de lípidos oxidables (principalmente PUFA), peróxidos preformados, contenido de antioxidantes y posiblemente proteínas asociadas a LDL. Las partículas de LDL contienen pocas moléculas antioxidantes (la proporción de antioxidantes a los lípidos es alrededor de 1/1500 o 1/2000 mol/mol en el núcleo de LDL y alrededor de 1/200 mol/mol en la monocapa externa), y la proporción de PUFA es variable, oscilando entre el 25 y el 50 % de los ácidos grasos totales (Esterbauer y col., 1990). Como se mencionó anteriormente, la mayoría de las células presentes en la íntima arterial pueden promover la oxidación de LDL por sus enzimas siendo este proceso lo que se conoce como oxidación de LDL mediada por células, pero se requiere la presencia de metales de transición como hierro o cobre, mientras que los quelantes de metales pueden bloquear esta oxidación de LDL. Incluso en ausencia de células, las altas concentraciones de iones metálicos libres pueden oxidar LDL. En las lesiones ateroscleróticas avanzadas pueden encontrarse niveles elevados de iones metálicos. Si bien existen varios estudios sobre la relación entre los niveles plasmáticos de metales, principalmente hierro, y la aterosclerosis así como sobre la presencia de metales en muestras humanas de placas ateroscleróticas (Stadler y col., 2004 y 2012, Barchowsky y Ufelle, 2018 y Kraml, 2017) ambas cuestiones no se han logrado demostrar por completo; aunque si existen estudios *in vitro* que han demostrado que el tratamiento con hierro puede aumentar el estrés oxidativo y la susceptibilidad oxidativa de las LDL incubadas con células (Fuhrman y col., 1994 y Yuan y col., 2004). También existe evidencia creciente de que los tioles, particularmente la cisteína, pueden jugar un papel importante en la oxidación celular de las LDL mediada por metales; dependiendo de las concentraciones de trabajo y del medio de cultivo utilizado, los tioles reaccionarían con metales generando radicales superóxido (Sparrow y Olszewski, 1993; Yoshida y Kisugi, 2010). Además se sabe que las lesiones ateroscleróticas tienen un pH bajo en los sitios de lesión y que lo mismo ocurre en el espacio extracelular; esto ha abierto un nuevo abanico de estudios sobre el mecanismo de la oxidación celular de las LDL mediada por metales: en presencia de hierro es más rápida a pH ácido, mientras que en el caso del cobre la situación sería más compleja ya que la acidez ralentiza la oxidación inicial, medida por dienos conjugados, hidroperóxidos y sustancias

reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), pero puede aumentar las etapas posteriores de oxidación de LDL medida por aumento captación de macrófagos (Leake, 1997). La presencia de cobre o hierro libres *in vivo* es improbable, la ceruloplasmina y la transferrina, respectivamente, son las encargadas de transportar esos iones metálicos en la sangre. La ceruloplasmina se consideró como un antioxidante, pero se ha verificado su potente actividad oxidante en las moléculas de LDL. La hemina (producto de degradación de globina), transferrina (holoproteína de unión a hierro) y ferritina pueden catalizar la oxidación de LDL (Yoshida & Kisugi, 2010).

Tribble y col. (1996) estudiaron la oxidación de LDL dependiente de metales: la oxidación exclusiva de la superficie de las partículas de LDL da lugar a la aparición de las propiedades biológicas de las denominadas LDL mínimamente oxidadas. Por otro lado, la lesión oxidativa de los lípidos de la zona del núcleo de las LDL se asocia con una pérdida de las características de la LDL mínimamente oxidada y con un aumento de las características de la LDL completamente oxidada sugiriendo que este grado de oxidación “completa” ocurre en el núcleo. La lesión oxidativa de las LDL se inicia en la superficie de las partículas de LDL, y posteriormente se transfiere al núcleo, posiblemente en asociación con la fase acelerada de la peroxidación lipídica de las LDL.

Los lípidos presentes en la molécula de LDL, sobre todo los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), son bastante vulnerables al ataque de los radicales libres. Una vez iniciada, la oxidación de LDL es un proceso dirigido por radicales libres, es decir una reacción en cadena de peroxidación lipídica. Esta se inicia por ataque de radicales libres sobre un doble enlace de un ácido graso poliinsaturado para formar el radical peroxilo. Un radical peroxilo de PUFA en una molécula de LDL puede abstraer un átomo de hidrógeno de un PUFA adyacente para formar un hidroperóxido y otro radical lipídico, una reacción que da como resultado la propagación de la cadena. La eliminación de átomos de hidrógeno por el radical peroxilo de otros lípidos, incluido el colesterol, finalmente produce oxiesteroles. Los hidroperóxidos lipídicos se fragmentan en aldehídos de cadena más corta, incluido el malondialdehído y 4-hidroxinonenal. Estos aldehídos reactivos se pueden unir a los grupos amino de la apo B-100, dando a la proteína una carga neta negativa incrementada. Esta modificación altera el dominio específico de cargas positivas de restos de lisina, arginina e histidina en la apo B que reconoce el receptor de LDL clásico, aumentando el reconocimiento por el receptor scavenger. Las ROS también pueden inducir la fragmentación de apo-B, produciendo péptidos que varían de 14 a 500 kDa. (Young y McEneny, 2001).

#### *Ensayos in vitro*

La susceptibilidad a la oxidación *in vitro* de las LDL de diferentes sujetos es muy variable dependiendo del contenido de PUFA, vitamina E, peróxidos lipídicos, subfracciones de LDL y condiciones patológicas (por ejemplo, hipercolesterolemia y diabetes). Existe una gran variedad de métodos desarrollados para evaluar la actividad de compuestos potencialmente antioxidantes

frente a la oxidación de las LDL. En estos métodos, las LDL previamente aisladas se someten a un proceso de inducción de la oxidación que se puede realizar en varias condiciones:

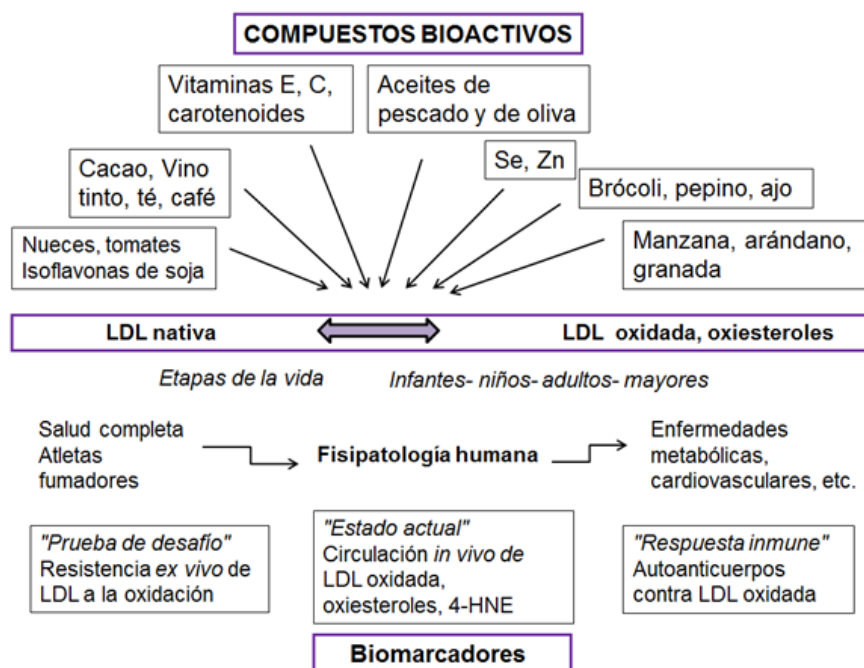
- a) Oxidación por células vasculares o macrófagos cultivados en medio libre de suero que contiene iones de metales de transición (cobre, hierro). Esta oxidación está mediada por mecanismos múltiples que implican radicales libres, tioles y peroxinitrito así como enzimas (lipoxigenasa y mieloperoxidasa) (Yoshida y Kisugi, 2010).
- b) Oxidación mediada únicamente por iones de metales de transición. Esta ocurre a través de una secuencia de tres fases típicas de la autooxidación lipídica explicada unos pocos párrafos antes.
- c) Oxidación desencadenada por radicales libres generados por otros sistemas tales como enzimas oxidantes (xantina oxidasa, glucosa oxidasa); productos químicos (radicales libres orgánicos, peróxidos), fotosensibilizadores (Rose Bengal); radiación UV-C o por transferencia de lípidos oxidados (por ejemplo, PUFA oxidados por lipoxigenasas) (Salvayre y col., 2016)

### **Antioxidantes, alimentación y oxidación de LDL**

Dentro de los factores de riesgo principales de la ECV y la aterosclerosis en sí misma se encuentran las dietas no saludables y la obesidad, además del consumo de tabaco, la hipertensión, la inactividad física o el consumo nocivo de alcohol (OMS, 2008). Existen actualmente una gran variedad de biomarcadores de daño generado por especies reactivas del oxígeno que se utilizan también en la cuantificación de la protección antioxidante. Entre otros biomarcadores de la peroxidación lipídica, la oxidación de las LDL ha atraído una gran atención, dado su papel fisiopatológico para iniciar y perpetuar la compleja cascada de eventos en la aterosclerosis. Como se presenta en el **Esquema 3.3** una variedad de compuestos alimenticios bioactivos han sido evaluados por sus posibles efectos protectores sobre la oxidación de las LDL, como un marcador de la transición de un estado de salud a un estado de enfermedad metabólica y cardiovascular. En los ensayos se pueden recopilar metodologías que incluyen la resistencia de LDL *ex vivo* a un modelo de estrés oxidativo definido (inducido), la determinación de LDLox circulante, oxisteroles y 4-hidroxinonenal (HNE), y la presencia de autoanticuerpos contra LDLox. como biomarcadores del estado *in vivo*. Estos biomarcadores se han evaluado ampliamente en sujetos en distintas etapas de la vida, desde la infancia hasta la edad más avanzada, en sujetos sanos, incluidos atletas y fumadores, así como en pacientes con diferentes enfermedades (Winklhofer-Roob y col., 2017).

La alimentación se ha convertido en uno de los aspectos fundamentales a la hora de prevenir este tipo de enfermedades. EL estudio de antioxidantes capaces de inhibir la oxidación de las LDL incluye una gran variedad de compuestos capaces de inhibir la oxidación de LDL mediante la captación de ROS, quelación de metales prooxidantes y unión con la apo-lipoproteína B, lo que promueve el acceso de antioxidantes a los lípidos y evita la interacción con prooxidantes (Shahidi y Zhong, 2015). Los antioxidantes son agentes potencialmente anti-aterogénicos y por lo tanto

reducen el riesgo de enfermedades cardiovasculares; la potencia de su capacidad anti-aterogénica puede evaluarse mediante la prevención de la oxidación de las LDL. Los PUFAs presentes en las moléculas de LDL están protegidos contra el ataque de radicales libres y la oxidación por un número de antioxidantes de naturaleza lipofílica (Esterbauer y col., 1992). Una gran variedad de compuestos alimentarios han sido probados por sus posibles efectos protectores sobre la oxidación de LD. Por ejemplo, varios estudios apoyan la idea de que la ingesta de vitaminas, por ejemplo la vitamina E (Carpenter y col., 2003) protegen contra la oxidación de LDL en la aterosclerosis; de manera similar, se ha demostrado la posibilidad de reducir la propensión a la oxidación de las LDL en pacientes diabéticos mediante el consumo de preparados enriquecidos en  $\beta$ -caroteno (Levy y col., 2000). Los aceites vegetales también han recibido gran atención en este sentido, por ejemplo se ha demostrado que el aceite de oliva aumenta significativamente la resistencia de las LDL a la oxidación (Nicolaiew y col., 1998; Marrugat y col., 2004). Otro ejemplo es el efecto positivo en la reducción de la susceptibilidad de las LDL de diferentes tipos de cacao y chocolate, fuentes de polifenoles, que incluyen polvo de cacao (Baba y col., 2007, Loffredo, y col., 2017) y chocolate negro (Wan y col., 2001). Productos derivados de la uva (Yamakoshi y col., 1999) y del vino tinto (Chopra y col., 2000; Tsang y col., 2005) ricos en polifenoles y antocianinas tienen también un efecto beneficioso antioxidante medidos sobre las LDL. De manera similar, distintos tipos de té (y derivados), mate y café de distintos orígenes han demostrado tener un efecto sobre la disminución de la oxidación de las LDL y se considera tienen un potencial efecto anti-aterogénico (Yokozawa y col., 2002, Yukawa y col., 2004, Matsumoto y Bastos, 2009, Carru y col., 2011, Suzuki-Sugihara y col., 2016). Por último se han evaluado una gran variedad de productos vegetales como el tomate (Visioli y col., 2003) y el jugo de tomate (Maruyama y col., 2001), cuyo contenido de licopeno tiene un efecto en la disminución de la velocidad de oxidación de LDL; los componentes del ajo (Lau, 2015) también han demostrado un efecto en la disminución de la oxidación de las LDL lo que explica sus efectos beneficiosos en la salud cardiovascular.



Esquema 3.3. Evaluación de la oxidación de LDL como biomarcador de daño oxidativo lipídico y en la determinación de actividad antioxidante de compuestos bioactivos (Winklhofer-Roob y col., 2017)

La información sobre la acción de péptidos dietéticos contra la oxidación de LDL es escasa. (Decker y col., 2001) demostraron que la carnosina y la histidina inhibían la oxidación de LDL promovida por  $\text{Cu}^{+2}$ . Fracciones de péptidos purificadas a partir de un hidrolizado extensivo de proteína de garbanzo han mostrado también esta capacidad y su efecto antioxidante fue atribuido a la formación de quelatos de cobre a través del anillo de imidazol del aminoácido histidina (Torres-Fuentes y col, 2015). Péptidos con carga positiva derivados de caseína presentaron un excelente efecto de inhibición sobre la oxidación de LDL y se propusieron como antioxidantes naturales para la prevención de la aterosclerosis humana (Wang y col., 2016).

## OBJETIVOS

### Objetivo general

El objetivo de este Capítulo fue evaluar la capacidad de péptidos de amaranto generados por digestión gastrointestinal simulada para prevenir la oxidación *in vitro* de las LDL, tratando de correlacionar la estructura y propiedades fisicoquímicas y la actividad de los mismos.

### Objetivos específicos

- Optimizar métodos para el seguimiento de la oxidación *in vitro* de las LDL.
- Evaluar la capacidad del digerido gastrointestinal, sus fracciones obtenidas por FPLC y los péptidos sintéticos de prevenir o retardar la oxidación de las LDL.
- Analizar relaciones entre estructuras y características fisicoquímicas de péptidos y actividad.
- Establecer posibles mecanismos de acción.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Muestras proteicas

Las muestras proteicas de amaranto utilizadas fueron las obtenidas y caracterizadas en el Capítulo 1.

- Aislado proteico (**A**) sometido a digestión gastrointestinal simulada (**Ad**)
- **Fracciones de Ad** obtenidas por cromatografía FPLC de filtración en gel.
- **Péptidos sintéticos** derivados de la digestión gastrointestinal de **A**.

### 2.2. Ensayo de inhibición de la oxidación de LDL

#### 2.2.1. Recolección de muestras de sangre

Se obtuvieron muestras de sangre por venopunción de 5 voluntarios sanos con 12 horas de ayuno utilizando una solución de citrato trisódico 130 mM, pH = 7,2 (Wiener lab.) como anticoagulante. Se separó el plasma mediante centrifugación inmediata (1000 x g, 20 min, 4 °C), se mezclaron las 5 muestras y se almacenó a -80 °C hasta el momento de su uso. Los voluntarios dieron su consentimiento y se respetaron los principios de la Declaración de Nüremberg, Helsinki y Tokio; el protocolo experimental fue aprobado por el Comité de Ética y Bioética de la Investigación (COBIMED) de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

#### 2.2.2. Obtención de LDL

Las LDL fueron precipitadas mezclando volúmenes iguales de plasma y reactivo precipitante de LDL (polivinil sulfato, ByoSystems S.A., Barcelona, España) y de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La fracción de LDL precipitada se lavó con solución fisiológica, se centrifugó y finalmente se resuspendió en buffer fosfato salino PBS (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5 mM, NaCl 138 mM, KCl 3 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8.1 mM, pH = 7,4) mediante agitación a 500 rpm, 25 °C, 15 min, (Temomixer Eppendorf). La concentración de proteína en la suspensión de LDL se determinó por el método de Lowry (Lowry y col., 1951) y la concentración de colesterol mediante un kit comercial específico (ByoSystem).

#### 2.2.3. Oxidación de LDL

Para optimizar la reacción de oxidación de LDL, se realizaron pruebas experimentales preliminares basadas en trabajos publicados (Scheffer y col., 2000 y Scoccia y col., 2001) en las cuales se evaluó el agregado de diferentes concentraciones de Cu<sup>+2</sup> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. El protocolo final al que se arribó fue el siguiente: se mezclaron, en ese orden, 100 µL de LDL (concentración final = 1 mg de proteína/mL), 55 µL de muestra o buffer fosfato 35 mM pH 7,8 (control), 15 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,3 % p/v en PBS, concentración final = 0,02 % p/v) y finalmente 30 µL de CuSO<sub>4</sub> 100 µM (solución preparada inmediatamente antes de su uso en agua MilliQ, concentración final = 15 µM)). La mezcla de reacción se incubó a 37 °C durante 4 h.



### 2.3. Monitoreo de la formación de dienos conjugados (CD)

Se prepararon las mezclas de reacción como se mencionó en el punto anterior en placa de fondo plano apta para UV de 96 pocillos (Corning LS, EEUU). Durante el período de incubación con agitación se monitoreó la formación de CD leyendo la absorbancia a 234 nm cada 5 min en un lector de microplacas (SYNERGY HT-SIAFRT, Biotek Instruments, EEUU). Para el análisis de los datos se midió  $\Delta\text{Abs} = (\text{Abs}_t - \text{Abs}_0)$  en función del tiempo de incubación (t). Se utilizó Trolox (SIGMA) como antioxidante conocido. Se evaluó la capacidad de prevenir la oxidación de LDL de diferentes concentraciones de fracciones solubles de **A** y **Ad**, fracciones de filtración en gel de Ad y péptidos sintéticos. Para cada ensayo las mediciones se realizaron al menos por triplicado. Finalmente las curvas se ajustaron utilizando GraphPad Prism versión 5.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU) mediante el ajuste a una regresión no lineal según la ecuación Sigmoidal Dosis-Respuesta (pendiente variable):

$$Y = B + \frac{T - B}{1 + 10^{(X_{50} - X)P}}$$

Y =  $\Delta\text{Abs}$

T =  $\Delta\text{Abs}$  máxima

X = tiempo (t)

$X_{50} = t_{50}$ , tiempo en el que el valor de  $\Delta\text{Abs}$  es la mitad de  $\Delta\text{Abs}$  máxima,

P = velocidad de propagación (VP), la parte inferior se limitó a un valor constante de 0. Además de estos parámetros se determinó el tiempo lag (LT) considerado como el tiempo en el que la  $\Delta\text{Abs}$  medida es el 10 % de la  $\Delta\text{Abs}$  máxima.

### 2.4. Determinación de sustancias reactivas al ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS)

Al finalizar el tiempo de incubación (4 h a 37 °C) se detuvo la reacción de oxidación con el agregado de EDTA (concentración final 1,5 mg/mL). Se mezclaron 40  $\mu\text{L}$  de muestra con 100  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético (20 % p/v, pH = 3,5) y 100  $\mu\text{L}$  de solución de TBA (0,78 % p/v). Después de incubar a 90 °C, 45 min y centrifugar (2000 x g, 5 min) se midió la fluorescencia ( $\lambda_{\text{exc}} = 485 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 528 \text{ nm}$ , SYNERGY HT-SIAFRT, Biotek Instruments, EE. UU.) (Scoccia y col., 2001).

### 2.5. Evolución de la fluorescencia

Se prepararon mezclas de reacción tal como se indicó en el punto 2.2.3 en placas negras aptas para la medida de fluorescencia (Greiner Bio-One). Se midió la fluorescencia ( $\lambda_{\text{exc}} = 360 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$ , SYNERGY HT-SIAFRT, Biotek Instruments, EE. UU.) cada 5 min durante la incubación a 37 °C (4 h) para evaluar la interacción entre los productos de oxidación de lípidos y grupos amino libres (presentes por ejemplo en residuos de lisina) (Cominacini y col., 1991). Para cada ensayo, las mediciones se realizaron al menos por triplicado. De forma similar a la evolución de CD, las

curvas ( $\Delta F$  frente a  $t$ ) se ajustaron de acuerdo con el modelo Sigmoidal Dosis-Respuesta (pendiente variable) (ver punto 2.3.).

## **2.6. Electroforesis en gel de agarosa**

Después de 4 h de incubación, la reacción de oxidación se detuvo mediante la adición de EDTA (concentración final = 1,5 mg / mL) y se evaluó la movilidad electroforética en gel de agarosa utilizando un equipo B2-BP Owl (Thermo Scientific, EE. UU.) (Carnevale y col., 2007; Trostchansky y col., 2001). El material utilizado se detalla a continuación:

- Gel de agarosa: 0,006 g de agarosa/mL, 0,5 % en buffer de corrida (Tris-Glicina pH = 8,3)
- Buffer de muestra 5x: 0,58 mL de glicerol + 0,42 mL de H<sub>2</sub>O + 1 mL de buffer corrida 10x
- Buffer corrida: Tris-Glicina 1x pH = 8,3
- Solución de fijación: 250 mL de etanol:acético:agua (60:10:30)
- Solución de tinción: Coomassie Brilliant Blue R-250 0,15% en Destain.
- Solución de Destain (decoloración): MeOH:acético:H<sub>2</sub>O (35:25:40).
- Se sembraron por calle 20  $\mu$ L de solución de muestra (4  $\mu$ L de buffer de muestra 5x + 16  $\mu$ L de muestra) con una cantidad final de proteína entre 10 a 20  $\mu$ g.

La corrida se realizó a un voltaje constante de 65 V (intensidad inicial de 40 mA) durante 45 min seguido de 90 V durante 15 min. Luego se colocó el gel en solución de fijación el tiempo necesario y se secó el gel por peso entre papel de filtro seco. Las bandas se revelaron tiñendo con Coomassie Brilliant Blue y se decoloraron.

## **2.7. Análisis estadístico**

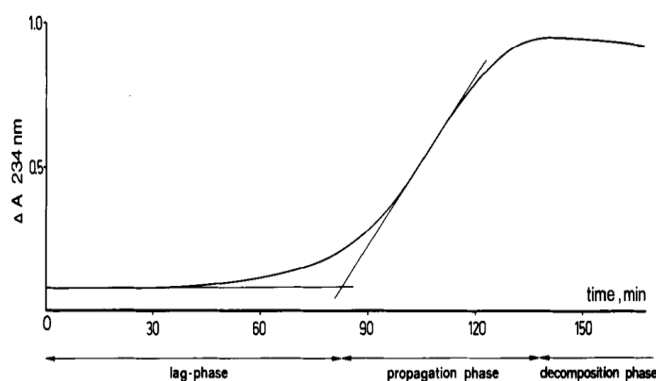
Los parámetros obtenidos fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA). Cuando las diferencias fueron significativas ( $p < 0,05$ ), los valores medios fueron evaluados mediante Diferencias Cuadradas Medias (LSD) usando el test de Tukey (Graph Pad Prism 5.0).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 2.A. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE *Ad*

#### 2.A.1 Ensayos preliminares para la optimización de la oxidación de las LDL

Como se explicó anteriormente, las LDL pueden oxidarse *in vivo* por diferentes mecanismos mientras que *in vitro* pueden modificarse oxidativamente en presencia de metales de transición como hierro y cobre. Se ha demostrado que esta LDL oxidada libre de células es indistinguible física, química y biológicamente de las LDL oxidadas por un sistema celular. Uno de los procedimientos más utilizados para medir la resistencia de las LDL a la oxidación *in vitro* iniciada por cantidades catalíticas de iones de metales de transición, es la determinación del tiempo de latencia (LT) para la formación de dienos conjugados (CD) (Esterbauer y col., 1987; Scheffer y col., 2000). Esterbauer y col., (1989) establecieron un método para la monitorización continua de la oxidación *in vitro* de las LDL humanas: después de la diálisis contra solución salina tamponada con fosfato para eliminar EDTA (utilizado como anticoagulante) a 4 °C, las LDL (50-100 µg/mL) se oxidan en presencia de 1-10 µmol de cobre a 37 °C, y la formación de dienos conjugados (DC) durante la oxidación de LDL se controla mediante cambios en absorbancia medida espectrofotométricamente a 234 nm. La forma de la curva obtenida se debe a las fases de iniciación y propagación de la oxidación; dependiendo del tiempo se puede ver o no la fase correspondiente a la descomposición (**Esquema 3.4.**).

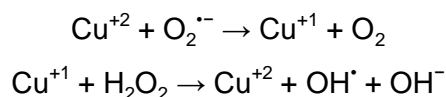


*Esquema 3.4. Cinética de oxidación de LDL mediante monitoreo continuo del cambio de absorbancia a 234 nm durante 3 h (Esterbauer y col., 1989).*

Durante la primera fase (de iniciación) los dienos no aumentan o lo hacen lentamente; los antioxidantes lipófilos presentes en la partícula de LDL protegen a los ácidos grasos poliinsaturados contra la oxidación, la acción protectora de estos antioxidantes disminuye progresivamente, ya que se inactivan y se consumen al eliminar los radicales libres hasta que finalmente el proceso de peroxidación lipídica entra en la fase de propagación. En esta segunda

fase los ácidos grasos poliinsaturados se convierten rápidamente en hidroperóxidos de lípidos conjugados, como lo indica el aumento de la absorbancia de 234 nm. Finalmente, la absorbancia disminuye lentamente después de alcanzar su valor máximo (fase de descomposición); lo que se debe a la descomposición de los hidroperóxidos lipídicos a través de una serie de reacciones consecutivas a una variedad de productos. Si bien los cambios de absorbancia entre las distintas fases no son abruptos, la forma de la curva permite diferenciarlas claramente y ajustar cada fase (o toda la curva) según su comportamiento para calcular parámetros cinéticos de la oxidación de las LDL.

Por otro lado, como ha sido previamente mencionado, los iones metálicos catalizan la formación del radical  $\text{OH}\cdot$  en presencia de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ); este radical es uno de los oxidantes biológicos más potentes (Halliwell, 1999). El ion cúprico ( $\text{Cu}^{+2}$ ) en presencia de un radical anión superóxido se puede reducir a ion cuproso ( $\text{Cu}^{+1}$ ) que es capaz de catalizar la formación de radicales  $\text{OH}\cdot$  por descomposición del peróxido de hidrógeno a través de la reacción de Fenton:



El radical hidroxilo es extremadamente reactivo y puede reaccionar con prácticamente cualquier molécula biológica como por ejemplo, los ácidos grasos insaturados (Jomova y Valko, 2011).

En el presente trabajo, en primer lugar y con el objetivo de optimizar el proceso de oxidación de las LDL, se llevaron a cabo ensayos sobre el sistema control (sin agregado de ninguna molécula antioxidante) expuesto a diferentes condiciones de inducción de la oxidación y monitoreando la formación de DC. La **Figura 2.1** muestra la evolución de DC para sistemas control preparados a partir de LDL (concentración final: 1 mg proteína/mL) en presencia de  $\text{Cu}^{+2}$  (concentración final = 15  $\mu\text{M}$ ),  $\text{H}_2\text{O}_2$  0,02 % p/v o ambos,  $\text{Cu}^{+2}/\text{H}_2\text{O}_2$  respetando las mismas concentraciones de cada uno utilizadas anteriormente. No se observó formación de DC durante el tiempo de ensayo para el sistema control en ausencia de  $\text{Cu}^{+2}$  y de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (C0, contiene únicamente LDL, **Figura 2.1**), así como en el sistema donde solo se añadió  $\text{H}_2\text{O}_2$  a las LDL (C2, **Figura 2.1**). Cuando solo se añadió  $\text{Cu}^{+2}$  como inductor de la oxidación, se observó un leve aumento de la absorbancia (C1, **Figura 2.1**). La producción de DC depende de las condiciones de reacción tales como las concentraciones de LDL y  $\text{Cu}^{+2}$ , la temperatura y la metodología de aislamiento de LDL (Kleinveld y col., 1992). Incluso cuando se usan condiciones idénticas para oxidar la LDL, los productos pueden diferir significativamente, dependiendo de la composición de ácidos grasos y el estado antioxidante de la preparación de LDL inicial (Levitan y col., 2010). Estos hechos podrían explicar la falta de formación de CD en el tiempo de ensayo en estos controles; es probable que el inicio de la oxidación requiera tiempos más largos en esas condiciones de reacción. Sin embargo, en presencia de  $\text{Cu}^{+2}/\text{H}_2\text{O}_2$ , se registró una curva típica de cinética de formación DC (C3, **Figura 2.1**). La cinética de la oxidación de LDL presentó una fase de latencia inicial (sin incrementos en la absorbancia),

seguida de una fase de propagación con una pendiente máxima correspondiente a la velocidad de propagación (VP) que se inicia presumiblemente después de que se han consumido los antioxidantes endógenos; finalmente se alcanza una fase de meseta (Jialal y Devaraj, 1996).

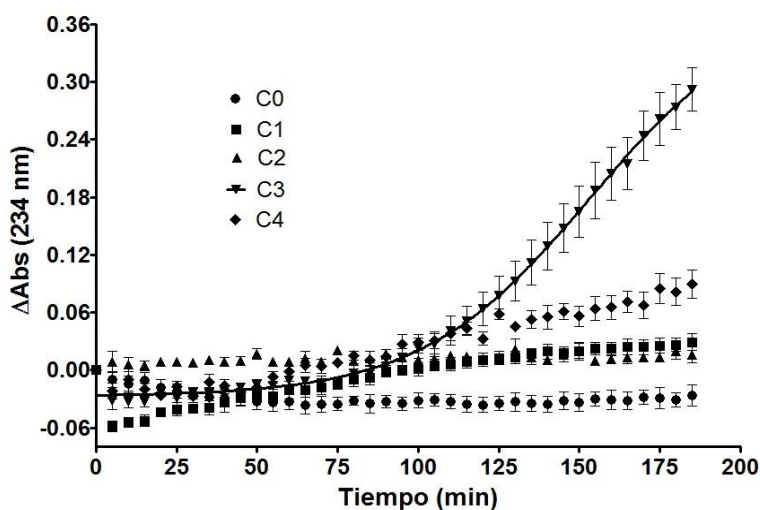


Figura 2.1. Evolución de la formación de dienos conjugados (DC) en distintos sistemas control: C0 = LDL + buffer; C1: LDL +  $\text{Cu}^{+2}$ ; C2: LDL +  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; C3: LDL +  $\text{Cu}^{+2}$  +  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; C4 = LDL +  $\text{Cu}^{+2}$  +  $\text{H}_2\text{O}_2$  + Trolox 0.1  $\mu\text{M}$ .

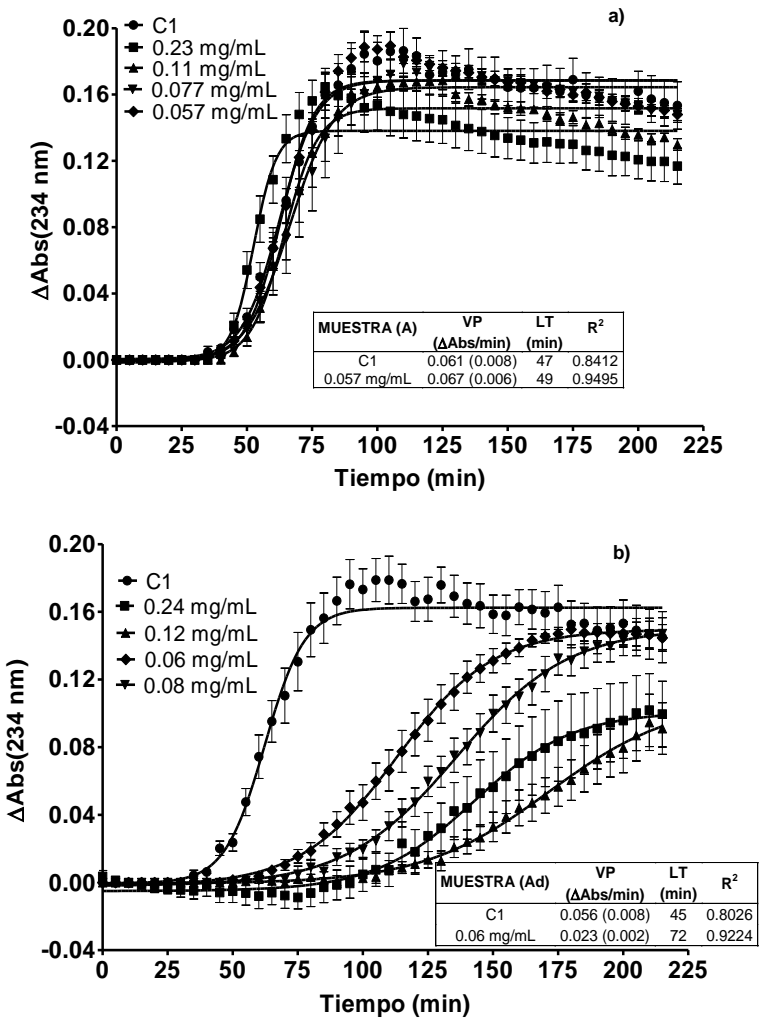
Por último, utilizando el protocolo correspondiente a C3 se midió el efecto del Trolox, un análogo de vitamina E soluble en medios acuosos. No se observó formación de DC con concentraciones en el intervalo de 1 a 5  $\mu\text{M}$  de Trolox (C4, Figura 2.1.), lo que indica que, en presencia de un antioxidante capaz de neutralizar radicales libres interrumpiendo la cadena de peroxidación lipídica, se previene la oxidación de LDL.

Es probable que en la generación de LDL oxidada *in vivo* ocurra por la acción consecutiva de varios agentes oxidantes y enzimas. Se ha demostrado que los radicales libres y no radicales ( $\text{H}_2\text{O}_2$  entre ellos) oxidantes están presentes en las lesiones ateroscleróticas (Levitan y col., 2010). En consecuencia, teniendo en cuenta esta información y los resultados previamente mostrados, se seleccionó la combinación  $\text{Cu}^{+2}/\text{H}_2\text{O}_2$  como inductores de oxidación para analizar el efecto de las muestras de amaranto en la oxidación de las LDL, utilizándose el control C3 como control de oxidación completa de LDL. Además, se decidió extender el tiempo de ensayo a 240 min para completar la fase de meseta de la curva.

## 2.A.2 Evaluación de la actividad de *Ad*

Se analizó la actividad de *Ad* frente a la oxidación de LDL en comparación con el aislado proteico sin digerir (*A*) para evaluar el efecto del proceso de digestión gastrointestinal. La presencia de *A* (0,057 - 0,23 mg de proteína/mL) no produjo modificaciones en la cinética de oxidación con respecto al sistema de control (Figura 2.2.a.). Sin embargo, cuando se agregó *Ad* a la mezcla de

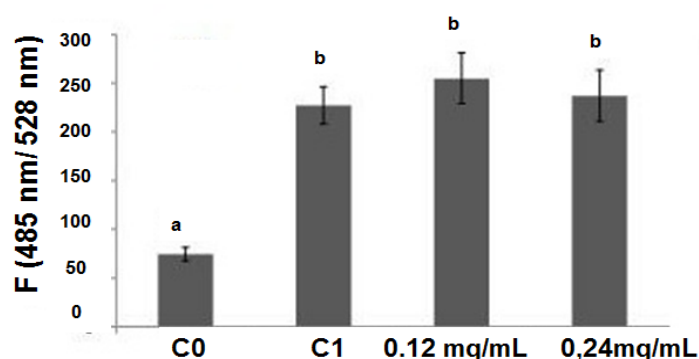
reacción, se registraron fuertes efectos, tales como incrementos considerables en el tiempo de inducción (LT) y una disminución en la velocidad de propagación (VP) (**Figura 2.2.b.**). Estas respuestas fueron dependientes de la concentración de péptidos/polipéptidos. En el caso de la muestra más diluida (0,057 mg/mL), pudo ajustarse una curva sigmoideal con un buen factor de correlación; el valor LT aumentó en aproximadamente 70 % y el valor VP fue aproximadamente 40 % del valor para el sistema de control. Para muestras más concentradas, las correlaciones del modelo sigmoideal fueron pobres dado que la oxidación fue fuertemente retrasada, como puede verse claramente en la **Figura 2.2.** LT aumentó en función de la concentración de proteína, logrando incrementos de aproximadamente 150 % con respecto al control (C1).



*Figura 2.2. Evolución de la formación de dienos conjugados (DC) (a) Sistemas en presencia de diferentes concentraciones de A. (b) Sistemas en presencia de diferentes concentraciones de Ad. Los valores de TL y VP se muestran en el cuadro. C1 control sin muestra: LDL + Cu<sup>+2</sup> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>*

A fin de obtener más información sobre los posibles mecanismos de acción de los péptidos de amaranto, se midieron otros parámetros relacionados con la oxidación de lípidos y proteínas en las partículas de LDL. Los ácidos grasos poliinsaturados de los lípidos LDL son los objetivos

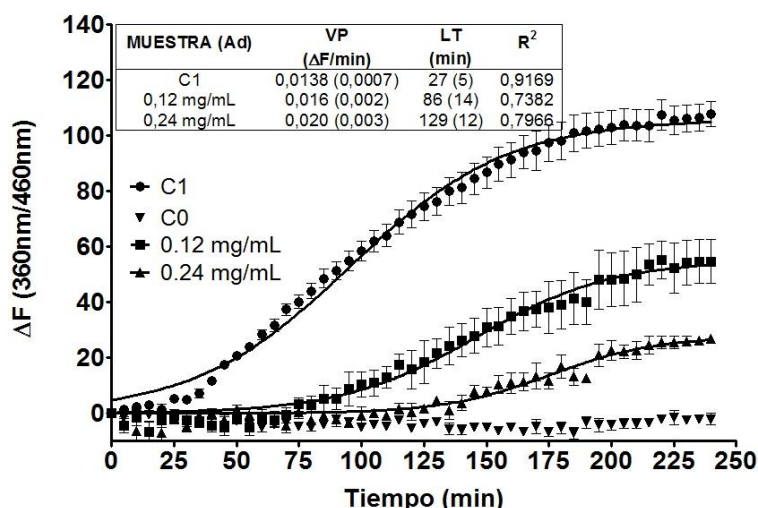
principales de los agentes oxidantes, siendo el derivado hidroperóxido de los fosfolípidos y el reordenamiento de los dobles enlaces para formar dienos conjugados los primeros productos de oxidación. La oxidación posterior da como resultado aldehídos de cadena corta o derivados carboxi, 4-hidroxinonenal (HNE) y malondialdehído (MDA) entre ellos (Levitan y col., 2010). Las sustancias reactivas a TBA (TBARS), como el MDA y otras sustancias, se midieron al final del período de incubación. La inducción de la oxidación con  $\text{Cu}^{+2}/\text{H}_2\text{O}_2$  (C1) produjo un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) de TBARS respecto a las LDL en las que no se indujo el proceso oxidativo (C0). Se evaluó el efecto de la presencia de **Ad** en dos concentraciones (0,12 y 0,24 mg/mL), las cuales no fueron capaces de reducir las TBARS con respecto al sistema control sin antioxidantes (**Figura 2.3**).



*Figura 2.3. Ensayo de TBA luego de 4 h de incubación a 37 °C en presencia de dos concentraciones de Ad. También se muestran los valores correspondientes a los controles C0 (LDL + buffer) y C1 (LDL +  $\text{Cu}^{+2}$  +  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Letras distintas significan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).*

Los aldehídos generados por la oxidación pueden formar aductos con los residuos de lisina de la apo B. Esta modificación de la proteína genera compuestos que fluorescen fuertemente a 430 nm con excitación a 360 nm (Cominacini y col., 1991). La evolución de la fluorescencia en función del tiempo se muestra en la **Figura 2.4** para sistemas que contienen **Ad** en dos concentraciones diferentes. Como puede observarse, cuando el proceso oxidativo no fue inducido (control C0), no se registraron cambios en la fluorescencia a lo largo de toda la incubación. En ausencia de **Ad** (C1), la fluorescencia presentó, de forma similar a la evolución de DC, un período de inhibición inicial y un segundo período de propagación durante el cual la fluorescencia aumentó rápidamente. Por lo tanto, los datos se ajustaron a la ecuación sigmoideal dosis-respuesta (pendiente variable) (**Figura 2.4**). Comparando la evolución de DC (**Figura 2.2**) con la evolución de la fluorescencia para C1 (**Figura 2.4**), puede observarse que, aunque LT fue menor para la fluorescencia, CD alcanzó el valor máximo antes de 100 min de incubación mientras que la formación de compuestos fluorescentes continuó hasta aproximadamente 200 min. Estas observaciones concuerdan con el hecho de que los DC son productos intermedios de la reacción

oxidativa en cadena, mientras que los compuestos fluorescentes pueden representar al menos uno de los productos del paso final, coincidiendo con la modificación de apo-B (Cominacini y col., 1991). En presencia de **Ad**, la aparición de compuestos fluorescentes se retrasó en función de la concentración peptídica (incremento de LT de aproximadamente 319% para 0,12 mg/mL y 477% para 0,24 mg/mL) (**Figura 2.4**).



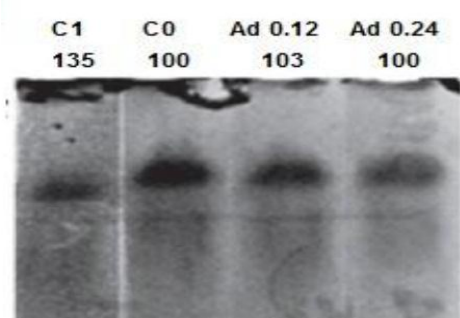
*Figura 2.4. Evolución de la fluorescencia durante de 4 h de incubación a 37 °C en presencia de dos concentraciones de Ad. También se muestran los valores correspondientes a los controles C0 (LDL + buffer) y C1 (LDL + Cu<sup>+2</sup> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).*

La modificación proteica da como resultado también la alteración de la movilidad electroforética. Las LDL tienen una superficie cargada negativamente y migran al ánodo durante la electroforesis en gel de agarosa en condiciones no desnaturalizantes. La oxidación hace que la molécula de LDL tenga una carga más negativa, posiblemente debido a la derivatización de residuos de lisina de apo B-100 por algunos aldehídos reactivos o por la acción directa de las especies reactivas del oxígeno que convierte residuos de histidina y prolina en aspartato o glutamato con carga negativa (Jialal y col., 1996). Los oxidantes no radicales como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, hipoclorito y peroxinitrito tienden a modificar las proteínas directamente, especialmente la cisteína, la metionina y la tirosina (Levitan y col., 2010). En los presentes sistemas las LDL oxidadas por Cu<sup>+2</sup>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (C1) presentaron mayor velocidad de migración que las LDL nativas (C0), siendo la distancia recorrida un 35 % mayor (**Figura 2.5**). En presencia de **Ad** (0,12 y 0,24 mg/mL), la movilidad de LDL fue similar a la de LDL nativa, indicando que estas muestras fueron capaces de prevenir las modificaciones que causaban el cambio de movilidad en las LDL oxidadas.

En un trabajo previo (Orsini Delgado y col., 2015) y también en este trabajo (Capítulo 1) se demostró que el digerido gastrointestinal de las proteínas de amaranto tiene la capacidad de inhibir la formación de radicales OH<sup>·</sup> por la reacción de Fenton (por péptidos quelantes de metales) así como para neutralizar estos radicales (rompiendo la cadena radicalaria mediante



donación de un átomo de hidrógeno). Estos mecanismos de acción podrían ser también relevantes en el retraso que produjo **Ad** en la oxidación de lípidos y proteínas inducida por  $\text{Cu}^{+2}/\text{H}_2\text{O}_2$  en las LDL. Teniendo en cuenta los resultados de DC (**Figura 2.2**), TBARS (**Figura 2.3**), fluorescencia (**Figura 2.5**), y electroforesis (**Figura 2.5**) es posible afirmar que **Ad** (concentraciones de 0,12 y 0,24 mg/mL) fue capaz de retrasar el comienzo de la oxidación de los lípidos y de las proteínas pero no pudo inhibir completamente estos procesos. La modificación en la fracción proteica producida por la oxidación de las LDL fue parcialmente inhibida como evidencia la evolución de la fluorescencia. Sin embargo, ese efecto inhibitorio fue suficiente para evitar cambios en la movilidad electroforética de las LDL.



*Figura 2.5. Electroforesis en gel de agarosa luego de 4 h de incubación a 37 °C en presencia de dos concentraciones de Ad. También se muestran los controles C0 y C1. El % de movilidad con respecto a las LDL nativas (C0) se muestra arriba de la imagen del gel.*

Campos Espinosa (2019) evaluó la actividad frente a la oxidación de LDL inducida por  $\text{Cu}^{+2}$  (24 h) de hidrolizados de proteínas de salvado de avena utilizando pepsina, pepsina + pancreatina, flavourzima, alcalasa y protamex. Se obtuvieron diferentes actividades entre los hidrolizados; los que presentaron mejor capacidad para inhibir la DC fueron correlacionados con mayor presencia de aminoácidos aromáticos; otros hidrolizados que indujeron una menor presencia hidroperóxidos de lípidos se correlacionaron con una alta capacidad de quelación de cobre.

## **2.B. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LAS FRACCIONES FPLC SEPARADAS A PARTIR DE Ad.**

Después de corroborar que **Ad** fue capaz de retardar la oxidación de LDL, se evaluaron las fracciones peptídicas (17-39) de **Ad** separadas de acuerdo con sus masas moleculares (FPLC de filtración en gel) (ver sección 1.B del Capítulo 1). Estas fracciones representan la mayor proporción de las moléculas generadas por la digestión gastrointestinal y corresponden a masas moleculares entre 2,7 y 0,14 kDa.

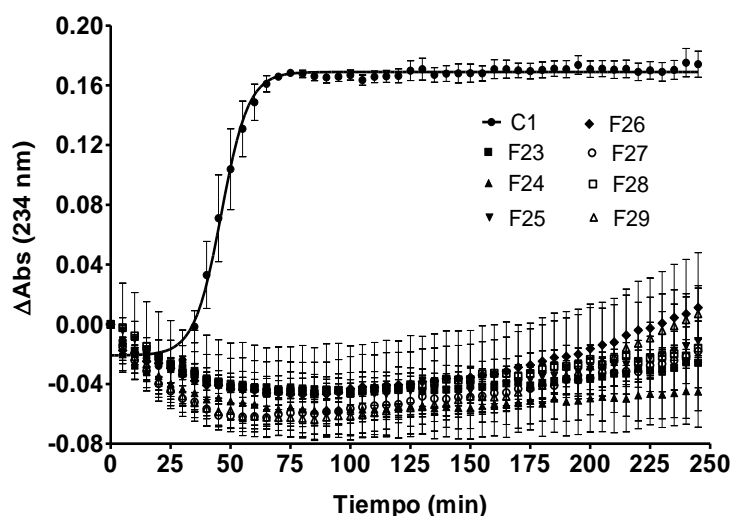
**Tabla 2.1. Parámetros cinéticos obtenidos a partir de la ecuación no lineal sigmoideal para la evolución de DC en sistemas con la presencia de fracciones de Ad separadas por FPLC.**

Muestra	Cprot (mg/mL)	PM (kDa)	VP (ΔAbs/min)	VP/V <sub>C1</sub> %	t <sub>50</sub> (min)	LT (min)	LT/LTc %	R <sup>2</sup>
F17	0.13 (0.01)	2.8-2.5	0.037 (0.004)	48	95 (1)	70 (4)	206	0.933
F18	0.27 (0.3)	2.5-2.2	0.028 (0.004)	37	123 (2)	89 (7)	265	0.874
F19	0.19 (0.07)	2.2-1.95	0.025 (0.002)	32	136 (2)	97 (5)	288	0.941
F20	0.232 (0.006)	1.95-1.7	0.018 (0.004)	24	138 (5)	85 (17)	253	0.701
F21	0.31 (0.08)	1.7-1.5	0.017 (0.003)	22	147 (5)	92 (14)	272	0.777
F22	0.32 (0.03)	1.5-1.4	0.017 (0.004)	23	167 (7)	113 (20)	334	0.674
F23	0.03 (0.03)	0.59-0.52	0.028 (0.002)	36	139 (1)	105 (3)	311	0.949
F31	0.10 (0.01)	0.52-0.46	0.026 (0.001)	34	149.1 (0.9)	112 (3)	333	0.967
F32	0.054 (0.001)	0.46-0.41	0.027 (0.001)	36	151 (1)	116 (3)	345	0.962
F33	0.011 (0.006)	0.41-0.36	0.034 (0.003)	44	120 (1)	92 (2)	272	0.934
F34	0.09 (0.01)	0.36-0.32	0.059 (0.005)	77	80.5 (0.8)	64 (2)	191	0.939
F35	0.24 (0.04)	0.32-0.29	0.070 (0.006)	92	72.7 (0.6)	59 (2)	175	0.952
F36	0.270 (0.002)	0.29-0.25	0.086 (0.009)	111	64.4 (0.6)	53 (2)	158	0.934
F37	0.32 (0.04)	0.25-0.22	0.099 (0.008)	129	52.7 (0.4)	43 (1)	128	0.971
F38	0.009 (0.004)	0.22-0.20	0.12 (0.01)	154	40.5 (0.4)	32 (1)	96	0.958
F39	-	0.20-0.18	0.10 (0.02)	133	39.6 (0.9)	30 (3)	90	0.843
F23 (1/5)	0.016 (0.007)	1.4-1.2	0.049 (0.005)	63	70 (1)	50 (3)	149	0.902
F23 (1/2)	0.04 (0.02)		0.021 (0.003)	27	134 (3)	88 (9)	259	0.855
F24 (1/5)	0.06 (0.01)	1.2-1.1	0.049 (0.006)	64	79 (1)	59 (4)	176	0.869
F24 (1/2)	0.14 (0.01)		0.024 (0.003)	31	128 (3)	89 (8)	262	0.872
F25 (1/5)	0.018 (0.01)	1.1-0.95	0.042 (0.004)	54	79 (1)	56 (4)	165	0.901
F25 (1/2)	0.044 (0.003)		0.024 (0.003)	32	135 (2)	96 (6)	284	0.907
F26 (1/5)	0.06 (0.02)	0.95-0.85	0.033 (0.004)	43	89 (2)	60 (5)	179	0.848
F26 (1/2)	0.2 (0.1)		0.024 (0.008)	32	139 (6)	100 (18)	295	0.527
F27 (1/5)	0.038 (0.001)	0.85-0.75	0.034 (0.004)	45	86 (2)	58 (5)	171	0.862
F27 (1/2)	0.094 (0.003)		0.020 (0.002)	26	144 (3)	97 (9)	287	0.876
F28 (1/5)	0.04 (0.03)	0.75-0.65	0.041 (0.005)	54	90 (2)	67 (4)	198	0.861
F28 (1/2)	0.09 (0.06)		0.018 (0.003)	23	163 (4)	109 (13)	323	0.821
F29 (1/5)	0.012 (0.009)	0.66-0.59	0.045 (0.004)	59	89 (1)	68 (3)	201	0.919
F29 (1/2)	0.03 (0.02)		0.021 (0.004)	27	190 (6)	145 (15)	428	0.736

Al realizar los ensayos de monitoreo de los DC, se observaron diferentes comportamientos entre las distintas fracciones. Las fracciones 34 a 39 exhibieron bajo o nulo efecto antioxidante: algunas de ellas (F34 a F37) presentaron un moderado incremento en el LT, mientras que otras (F38 y F39) redujeron estos valores. Además, se registraron incrementos en la VP para algunas muestras (F36 a F39), una respuesta diferente a la del resto de las fracciones (**Tabla 2.1**). Estos resultados indican que las fracciones con masas moleculares atribuibles a aminoácidos libres (F36 a F39) no tuvieron la capacidad de prevenir la oxidación de lípidos del LDL, pudiendo incluso favorecerla en algunos casos. Por otra parte, las fracciones 17 a 22 y 30 a 33 produjeron un

incremento en el LT (1 a 2,5 veces con respecto al control) y una disminución en la VP (2 a 3 veces con respecto al control) (**Tabla 2.1**). Finalmente, en el caso de las fracciones 23 a 29 (0,52-1,25 kDa), no se registró formación de DC a lo largo de todo el período de incubación, lo que indica que la oxidación lipídica de las LDL se inhibió por completo en presencia de estas muestras (**Figura 2.6**).

Es importante notar que la actividad de las diferentes fracciones no estuvo únicamente relacionada con la concentración peptídica. Como puede observarse en la **Tabla 2.1**, las fracciones que exhibieron la mayor capacidad antioxidante, es decir 23 a 29, presentaron concentraciones similares o en algunos casos menores que otras con menor actividad (las concentraciones se muestran en la **Tabla 1.7.**, Capítulo 1), lo que sugiere que el mayor efecto antioxidante está asociado con el tipo de péptidos contenido en estas muestras. Para las fracciones 23 a 29, se ensayaron dos diluciones (1/2 y 1/5), obteniendo un buen ajuste al modelo sigmoideal en casi todos los casos; con la excepción de la muestra F26 (1/2), que produjo un fuerte retraso de la formación de DC. Para una misma muestra, el efecto antioxidante (incremento en LT y disminución en VP) fue dependiente de la concentración peptídica (**Tabla 2.1**).



*Figura 2.6. Evolución de dienos conjugados (DC) para las fracciones FPLC de filtración en gel (23-29) de Ad (sin dilución). También se muestran los valores correspondientes a C1 (LDL +  $\text{Cu}^{+2}$  +  $\text{H}_2\text{O}_2$ ).*

Las fracciones de filtración en gel con la mayor capacidad para inhibir la formación de DC (23 a 29) presentaron una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) de TBARS al final del tiempo de incubación con respecto al sistema sin antioxidantes (C1), siendo esta disminución más importante para las fracciones 25 y 26 (**Figura 2.7**). Es importante señalar que para estas fracciones (23 a 29) no se había registrado formación de DC (**Figura 2.6**) y, sin embargo,

presentaron un aumento de TBARS respecto al sistema no oxidado C0. Una posible explicación a esta aparente discordancia entre los resultados DC y TBARS podría ser la diferencia en la sensibilidad de ambos métodos dado que los DC fueron detectados por absorbancia mientras que las TBARS fueron detectadas por fluorescencia. Además, no se puede descartar el hecho de que  $H_2O_2$  puede producir algunos artefactos en el ensayo de TBA (Cecchini y col.,1990).

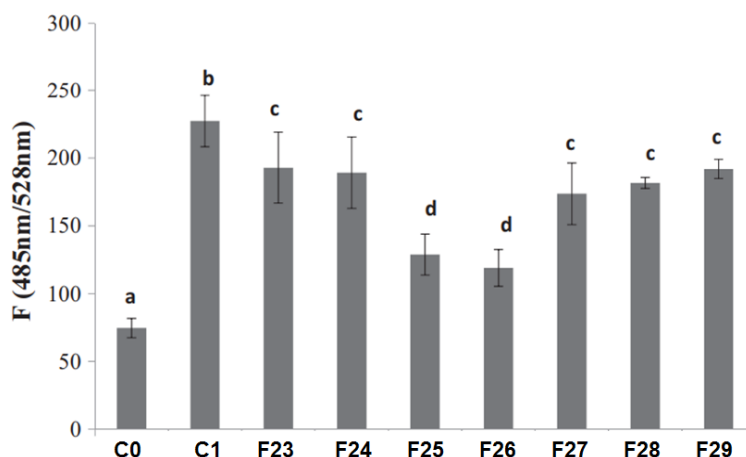


Figura 2.7. Ensayo de TBA después de 4 h de incubación a 37 °C en presencia de las fracciones FPLC (23 - 29). También se muestran los valores correspondientes a C0 (LDL + buffer) y C1 (LDL +  $Cu^{+2}$  +  $H_2O_2$ ). Diferentes letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Las fracciones 23 a 29 también fueron muy activas para prevenir la formación de compuestos fluorescentes (Figura 2.8.).

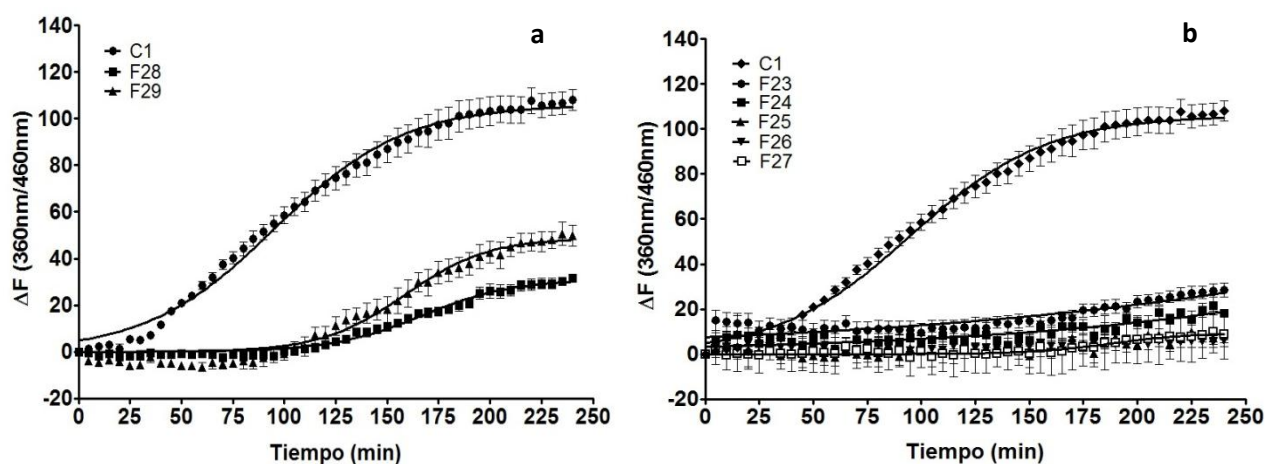
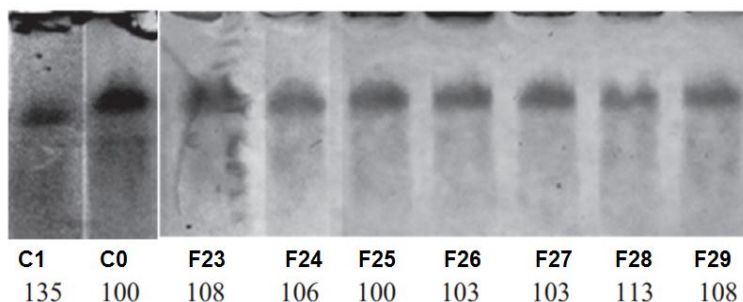


Figura 2.8. Evolución de fluorescencia durante la incubación (4 h) a 37°C en presencia de las fracciones FPLC de filtración en gel (23 - 29). También se muestra la curva correspondiente a C1 (LDL +  $Cu^{+2}$  +  $H_2O_2$ ).

Las fracciones 28 y 29 presentaron un retardo en el incremento de fluorescencia (LT aumentó 447

y 422 % respecto al sistema control C1, respectivamente, (**Figura 2.8.a**). Las fracciones 23 a 27 inhibieron completamente la formación de compuestos fluorescentes (**Figura 2.8.b**).

Los resultados de la electroforesis en gel de agarosa mostraron que las fracciones fueron capaces de prevenir total (F25, F26 y F27) o parcialmente (F23, F24, F28 y F29, en estos casos se registraron pequeños aumentos respecto a C0) los cambios de movilidad de las LDL (**Figura 2.9**).



*Figura 2.9. Electroforesis en gel de agarosa luego de la incubación (4 h) a 37 °C en presencia de las fracciones FPLC de filtración en gel (23 - 29). Debajo de cada calle se muestra el % de movilidad con respecto a LDL nativa (C0).*

En el Capítulo 1 se había determinado la actividad antioxidante de las fracciones FPLC en solución a través de los métodos ORAC (capacidad para neutralización de radicales ROO $\cdot$ ) y HORAC (capacidad para prevenir la formación de OH $\cdot$ ). Las fracciones más activas en la prevención de la oxidación de las LDL (23 a 29, 0,52-1,25 kDa) también presentaron una alta actividad en los ensayos de ORAC y algunas de ellas (fracciones 23, 24 y 28) registraron las mayores actividades HORAC, aunque en este ensayo las actividades fueron bajas en todos los casos debido a la concentración peptídica de las fracciones FPLC. Dada la manera de inducir la oxidación de las LDL utilizada (Cu $^{+2}$ /H $_2$ O $_2$ ), que como ya se ha mencionado produciría la formación de radicales OH $\cdot$  altamente reactivos, los péptidos podrían ejercer su acción tanto por prevención de la formación de OH $\cdot$  por quelación del cobre como por neutralización de estos radicales. Por otra parte, fracciones que también habían presentado actividades ORAC muy altas (fracciones 18 a 22 y 30 a 38) presentaron actividades menores frente a la oxidación de las LDL. Estos hechos sugieren que los péptidos no necesariamente actuarán de la misma manera en un sistema donde solo están en presencia de las ROS que cuando se encuentran en presencia de un complejo macromolecular como las LDL. Si bien podrían ejercer su capacidad de quelar metales o neutralizar radicales libres en el seno de la dispersión, no puede descartarse que los péptidos puedan interactuar con las LDL y ejercer alguna acción sobre la superficie de estas. Tampoco puede descartarse que las concentraciones requeridas en cada tipo de ensayo sean diferentes, sería de esperar que las concentraciones necesarias para lograr un efecto en el sistema de las LDL sean mayores que las necesarias para actuar frente a radicales en solución.

Es posible observar que aunque todas estas fracciones fueron capaces de inhibir completamente la formación de DC algunas de ellas no fueron capaces de inhibir por completo el incremento de fluorescencia (F28 y F29) o prevenir completamente cambios en la movilidad electroforética (F23, F24, F28 y F29). Las fracciones 25, 26 y 27 fueron las más efectivas en prevenir el daño proteico y, en el caso de F25 y F26, también en inhibir la formación de TBARS. Una posible explicación para estos resultados también podría estar relacionada con diferencias en la interacción péptido-LDL, como se mencionó anteriormente. También, podría ocurrir algún efecto directo de los oxidantes sobre las moléculas proteicas de las LDL (no mediado por participación de productos de la oxidación de lípidos), y estas modificaciones de proteínas se evitarían en presencia de algunas de las fracciones (25, 26 y 27) pero no en presencia de otras (23, 24, 28 y 29).

Para evaluar el tipo de péptidos (en cuanto a sus características de hidrofiliidad/hidrofobicidad) constituyentes, se analizaron los perfiles de cromatografía líquida de alta presión de fase reversa (RP-HPLC) cuya obtención se explicará detalladamente en el Capítulo 4, de algunas de las fracciones (23, 24, 26, 28 y 34) y de **Ad**. La fracción soluble de **Ad** mostró dos picos muy intensos de características hidrofílicas (tiempos de retención ( $t_R$ ) menores a 10 min) y una diversidad de picos que van aumentando su hidrofobicidad ( $t_R$  entre 10 y algo más de 30 min) (**Figura 2.10.A**). Los cromatogramas correspondientes a las fracciones presentaron diferencias. La fracción 23 (1,1-1,25 kDa) mostró mayoritariamente picos con  $t_R$  mayores de 15 min, indicando mayor abundancia de moléculas con carácter hidrofóbico (**Figuras 2.10.B**). A medida que nos movemos hacia fracciones de menores masas moleculares (26, 28 y 34, en el rango de 0,59 a 1,1 kDa), se registró una disminución de picos con  $t_R$  mayores a 20 min (moléculas más hidrofóbicas) y un aumento de picos con  $t_R$  menores a 20 min (moléculas más hidrofílicas) (**Figuras 2.10.C, D y E**). En función de estos resultados puede remarcarse que las fracciones que inhibieron completamente tanto las modificaciones lipídicas como proteicas de las LDL (tal como F26) están constituidas por una diversidad de moléculas tanto hidrofílicas como hidrofóbicas, sin predominio evidente de ninguna. Por otra parte, fracciones con predominio de moléculas con mayor carácter hidrofóbico (como F23) no fueron capaces de prevenir completamente las modificaciones electroforéticas, mientras que fracciones con menor componente hidrofóbico (como F28) no pudo prevenir completamente la formación de componentes fluorescentes ni los cambios electroforéticos. Finalmente, la fracción de menor masa molecular (alrededor de 0,3 kDa) y con mayor proporción de componentes hidrofílicos no presentó efectos antioxidantes sobre las LDL. Estas observaciones sugieren que una combinación de péptidos con diferentes características ampliaría los posibles mecanismos de acción y la capacidad de actuar en diferentes entornos.

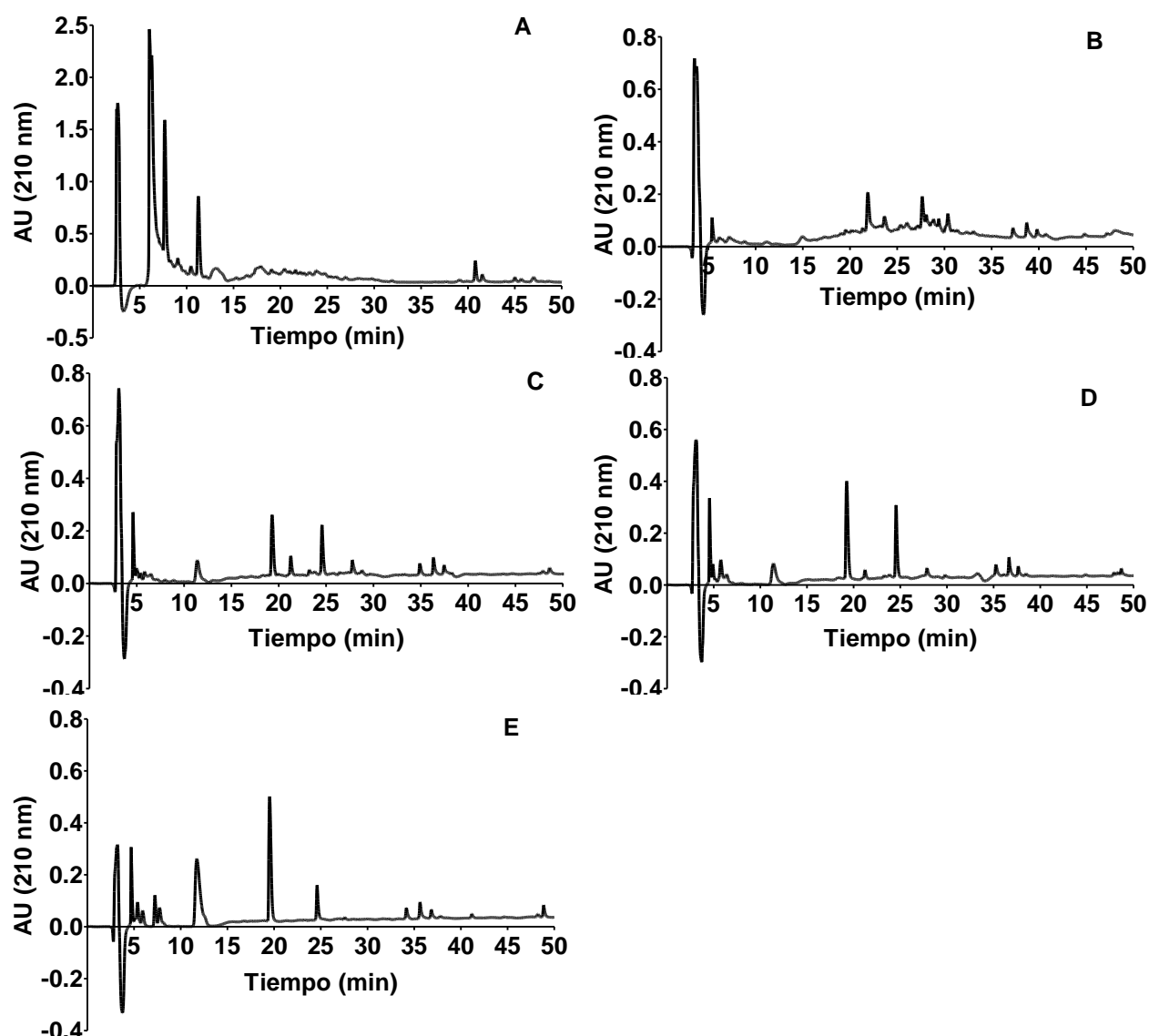


Figura 2.10. RP-HPLC de distintas fracciones separadas de Ad. A) Ad; B) F23; C) F26; D) F28; E) F34.

Viana y col. (1996) postularon que cuando las LDL son sometidas a oxidación mediada por cobre, generándose radicales libres a través de la reacción de Fenton, estos radicales solubles en agua pueden ser inicialmente captados por antioxidantes contenidos en la interfase agua-lípido de las LDL, incluyendo vitamina E originalmente presente. Una vez que estos antioxidantes son consumidos, los ácidos grasos y otros lípidos del core podrían ser oxidados. En función de ello y de los resultados previos, podemos postular que los péptidos más hidrófilos solubles en el medio acuoso podrían prevenir la oxidación de LDL al absorber los radicales libres solubles en agua y/o quelar metales, mientras que otros péptidos más hidrófobos podrían interactuar en la interfaz agua-lípido y eliminar radicales libres que lleguen a la interface o radicales lípidicos o proteicos que se formen por acción de los anteriores.

## 2.C. EVALUACIÓN DE LOS PÉPTIDOS SINTÉTICOS DERIVADOS DE *Ad*

Se evaluó la actividad frente a la oxidación de las LDL de los 10 péptidos sintéticos identificados a partir de *Ad* (concentración = 0,2 mg/mL). Respecto a la evolución de DC, P1 (TEVWDSNEQ) mostró un pequeño aumento (alrededor de 20 %) en el valor de LT sin modificación del valor de VP, mientras que P8 (AWEEREQGSR), P5 (YLAGKPQQEH) y P2 (IYIEQGNGITGM) produjeron solamente una disminución en el valor de VP (**Tabla 2.2**). P6 (LQAEQDDR) y P9 (AVNVDDPSK) presentaron un efecto moderado en ambos parámetros: aumento de TL y disminución de VP (**Tabla 2.2**). P3 (GDRFQDQHQ), P10 (KFNRPETT) y P4 (LAGKPQQEHSGEHQ) produjeron efectos mayores en ambos parámetros (**Tabla 2.2, Figura 2.11**). Por otra parte, en presencia de P7 (HVIKPPSRA, 0,2 mg/mL), la formación de DC fue completamente inhibida en el tiempo de ensayo (**Tabla 2.2, Figura 2.11**).

Para los tres péptidos más activos (P7, P3 y P10) se evaluó el efecto de la concentración peptídica (0,04-1 mg/mL) en la evolución de DC. Tanto el incremento del TL como la disminución de la VP, presentaron una dependencia con la concentración peptídica. En todos los casos, concentraciones de 1 mg/mL produjeron una inhibición total de la oxidación de LDL en el tiempo de ensayo (**Tabla 2.2**)



Tabla 2.2. Parámetros cinéticos obtenidos a partir del ajuste lineal sigmoidal para la evolución de DC en sistemas con presencia de péptidos sintético ( $c = 0,2 \text{ mg/mL}$ ).

Muestra	Secuencia	C(mg/mL)	$t_{50}$	VP	VP/VP <sub>C1</sub> %	LT	LT/LTC %	R <sup>2</sup>
C			37,0 (0,6)	0,18 (0,03)		32 (2)		0,919
P1	TEVWDSNEQ	0,2	44,0 (0,9)	0,18 (0,06)	100,62	39 (3)	122	0,8882
P2	IYIEQGNGITGM	0,2	38,8 (0,9)	0,15 (0,04)	81,97	32 (3)	102	0,8977
P3	GDRFQDQHQ	0,2	209 (9)	0,021 (0,005)	11,69	164 (19)	517	0,8399
P4	LAGKPQQEHSGEHQ	0,2	76,1 (0,9)	0,055 (0,005)	30,71	59 (3)	186	0,9728
P5	YLAGKPQQEH	0,2	44,6 (0,8)	0,070 (0,008)	39,13	31 (2)	98	0,9622
P6	LQAEQDDR	0,2	50,6 (0,8)	0,13 (0,03)	71,50	43 (2)	136	0,9363
P7	HVIKPPSRA	0,2	nd	nd	nd	nd	nd	nd
P8	AWEEREQGSR	0,2	43,2 (0,9)	0,11 (0,02)	58,85	34 (2)	108	0,9352
P9	AVNVDDPSK	0,2	45,9 (0,7)	0,14 (0,03)	79,40	39 (9)	124	0,9406
P10	KFNRPETT	0,2	108 (1)	0,032 (0,003)	17,80	78 (4)	247	0,9716
P3	GDRFQDQHQ	0,04	67 (2)	0,06 (0,01)	31	50 (6)	168	0,860
P3	GDRFQDQHQ	0,1	139 (3)	0,024 (0,04)	13	98 (10)	332	0,755
P10	KFNRPETT	0,04	51 (2)	0,121 (0,05)	66	42 (5)	143	0,739
P10	KFNRPETT	0,1	75 (2)	0,07 (0,02)	40	62 (6)	210	0,702
P7	HVIKPPSRA	0,04	51 (2)	0,12 (0,05)	71	31 (16)	105	0,872
P7	HVIKPPSRA	0,1	103 (2)	0,045 (0,008)	25	81 (16)	274	0,872

Los resultados se obtuvieron del ajuste de tres medidas. El error estándar en el cálculo de cada parámetro se expresa entre paréntesis.

nd: no determinado debido a que no se registró formación de CD a lo largo del tiempo de ensayo

Además, se analizaron los otros parámetros relacionados con la oxidación de lípidos y proteínas en las LDL para estos 3 péptidos que presentaron la mayor capacidad para prevenir la formación de DC. P3, P7 y P10 (0,2 mg/mL) fueron capaces de reducir significativamente ( $p < 0,05$ ) la formación de TBARS; el efecto fue mayor para P3 y P10 (**Figura 2.12**). Como ya se había descrito en la sección anterior, en el caso de P7 (0,2 mg/mL), no se registró aumento de los DC en el tiempo de incubación, pero sí un aumento (aunque disminuido respecto al sistema control)

de las TBARS, lo cual podría deberse a alguna cuestión de sensibilidad de los métodos o a la aparición de alguna sustancia interferente que reacciona con TBA.

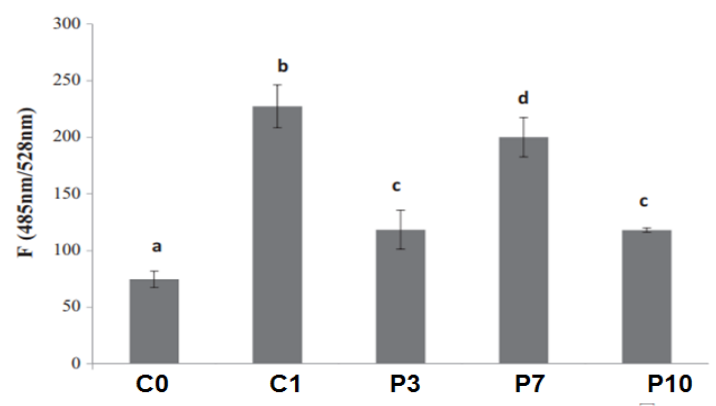


Figura 2.12. Ensayo de TBA luego de 4 h de incubación a 37 °C en presencia de péptidos (P3, P7 y P10). Letras distintas significan diferencias significativas ( $p<0,05$ ).

Por otro lado, P3 y P7 inhibieron completamente la formación de productos fluorescentes generados por reacción de productos de la oxidación lipídica con grupos amino libres de residuos aminoacídicos, mientras que P10 produjo un incremento del LT (315 %) para la formación de estos compuestos (**Figura 2.13**).

Finalmente, en la electroforesis en gel de agarosa, los tres péptidos previnieron completamente los cambios en la movilidad de las LDL provocados por la oxidación con  $\text{Cu}^{+2}/\text{H}_2\text{O}_2$ , presentando estos sistemas una movilidad similar a la de la LDL nativa (**Figura 2.14**).

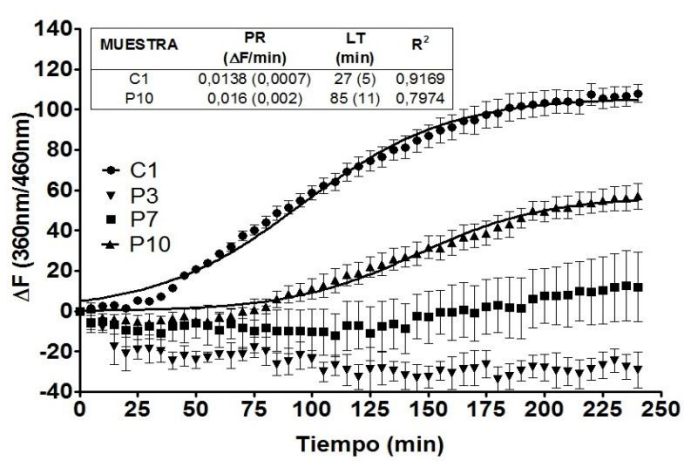


Figura 2.13. Evolución de la fluorescencia durante la incubación a 37 °C (4 h) en presencia de péptidos (P3, P7 y P10). Los valores de LT y VP se muestran en el recuadro.

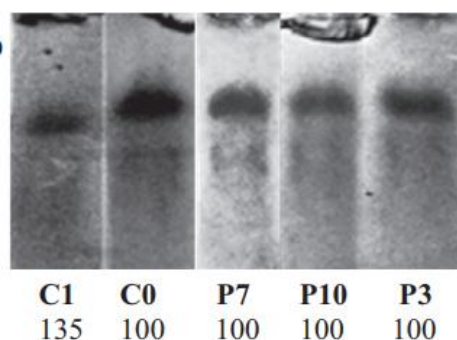


Figura 2.14. Electroforesis en gel de agarosa luego de 4 h de incubación a 37 °C en presencia de péptidos (P3, P7 y P10). El % de movilidad con respecto al LDL nativo (C0) se muestra debajo de la imagen del gel.

Previamente se demostró que cuatro de los diez péptidos analizados presentaban una alta actividad ORAC, concretamente: P8>P5-P2-P1, seguidos de P4>P7-P3 que mostraron una actividad mucho menor, mientras que P6, P9 y P10 no presentaron actividad en dicho ensayo para concentraciones de hasta 1 mg/mL (Orsini Delgado y col., 2016). Además, mediante el ensayo HORAC se registró el siguiente orden de actividad para soluciones 0,2 mg/mL de los péptidos: P8>P2>P5=P1>P4=P7=P6>P9; P3 y P10 sin actividad (Capítulo 1 de este trabajo). Comparando esos resultados en sistemas en solución con los obtenidos frente a las LDL, es posible observar que los péptidos con las actividades ORAC y HORAC más elevadas (es decir, P8, P5, P2) produjeron principalmente un efecto de reducción de la VP de la oxidación de las LDL. Estos péptidos tienen carga negativa o cercana a la neutralidad (**Tabla 1.9**) con una proporción mayoritaria de aminoácidos ácidos en el caso de P8, y de aminoácidos hidrofóbicos en el caso de P5 y P2. P2 es el más hidrofóbico de todos los péptidos analizados (**Tablas 1.9 y 1.10**). Todos estos péptidos presentan al menos un residuo aromático voluminoso en sus secuencias.

Sin embargo, los péptidos que presentaron la mayor actividad frente a la oxidación inducida por  $\text{Cu}^{+2}/\text{H}_2\text{O}_2$  de las LDL (P7, P3 y P10), no presentaron alta actividad de neutralización de radicales mediante el ensayo ORAC, incluso P10 no registró esta actividad de neutralización de radicales  $\text{ROO}\cdot$ . Tampoco tuvieron una actividad HORAC importante, P3 y P10 no presentaron inhibición de  $\text{OH}\cdot$  en concentraciones de 0,2 mg/mL. Por otra parte, estos tres péptidos presentan propiedades fisicoquímicas diversas: P7 es un péptido positivamente cargado que contiene una elevada proporción de aminoácidos alifáticos y básicos, con un considerable carácter hidrofóbico; P3 es un péptido con carga negativa con alta proporción de aminoácidos ácidos, es el péptido más hidrofílico de los analizados según el parámetro GRAVY y presenta alta superficie polar accesible al solvente. P10 es un péptido con carga positiva, sin predominio importante de ningún tipo de aminoácido, con carácter hidrofílico (sección 1C, Capítulo 1). Wang y col. (2016) informaron que los péptidos cargados negativamente pueden disminuir la velocidad de iniciación de la oxidación

de las LDL al reaccionar con el  $\text{Cu}^{+2}$  a través de un mecanismo de quelación de metales; en nuestro caso, los péptidos ácidos P1, P2, P6, P8 y P9 produjeron algunos efectos leves sobre LT y/o PR en la formación de CD (**Tabla 2.2**). Estos autores también informaron que las fracciones cargadas positivamente con alto contenido de aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina) pueden ser responsables de la alta capacidad de inhibición y que pueden actuar como terminadores de cadena y prevenir la propagación de la oxidación de LDL mediante la donación de hidrógeno para neutralizar el radical lipídico. En otro estudio, un hidrolizado de caseína obtenido con alcalasa fue separado en cuatro fracciones de acuerdo con sus cargas. Se evaluó el efecto inhibitorio de estas fracciones sobre la oxidación de LDL y la acumulación de lípidos celulares en un sistema libre de células ( $\text{Cu}^{+2}$ ) y un sistema basado en macrófagos Raw264.7 Las fracciones inhibieron significativamente la oxidación de las LDL y además evitaron la acumulación de lípidos celulares. Las fracciones cargadas positivamente mostraron efectos inhibitorios más fuertes que las fracciones cargadas negativamente. Se evaluaron además siete péptidos (PVEPF, EMPFPK, MPFPK, KEMPFPK, HKEMPFPK, QPH y HQPH) con diferentes propiedades de carga y se comprobó que con el aumento de la carga positiva neta, se mejoró la capacidad de los péptidos para inhibir la oxidación de las LDL. Los péptidos que contenían lisina presentaron mejor inhibición que los que contenían histidina (Pan y col., 2019). Esto presenta una correlación interesante con nuestros resultados ya que los péptidos más activos detectados en el presente trabajo son péptidos catiónicos (P7 y P10) o neutros (P3). Dos de estos péptidos (P7 y P3) presentan histidina y dos de ellos (P7 y P10) presentan lisina en sus secuencias, en diferentes ubicaciones de las moléculas. Se ha informado que los residuos de histidina pueden quelar iones metálicos, neutralizar el oxígeno activo y eliminar radicales  $\text{OH}\cdot$ , estas propiedades se atribuyen a su grupo imidazol (Megías y col., 2008; Udenigwe y Aluko, 2012), sin embargo P3 no registró actividad HORAC. P7, P3 y P10 contienen también aminoácidos aromáticos. Los anillos aromáticos densos en electrones de los residuos de fenilalanina (F), tirosina (Y) y triptófano (W) pueden contribuir a la quelación de iones metálicos pro-oxidantes, mientras que F también puede eliminar el  $\text{OH}\cdot$  para formar derivados hidroxilados para, meta- u orto-sustituidos más estables (Udenigwe y Aluko, 2012). Por otra parte, P7, P3 y P10 contienen aminoácidos hidrófobos. Los aminoácidos hidrofóbicos (por ejemplo, leucina (L), prolina (P)) son importantes para potenciar las propiedades antioxidantes de los péptidos, ya que pueden aumentar la accesibilidad de los péptidos antioxidantes a los objetivos hidrófobos, como puede ser LDL en este caso. De esta forma, además de la presencia de aminoácidos quelantes o neutralizadores de radicales como la histidina o las aromáticos, otras características estructurales podrían modificar la capacidad de los péptidos para interactuar con las partículas de LDL a fin de ser más capaces de prevenir su oxidación. Esto último, se demuestra por el hecho de que los péptidos que contienen histidina mostraron diferencias en el comportamiento frente a la oxidación de LDL, y este comportamiento no presentó una correlación directa con la capacidad de captura de especies reactivas de oxígeno

(ORAC) o con la inhibición de la formación de radicales  $\text{OH}\cdot$  por quelación (HORAC) medidas en los sistemas donde reaccionaron los péptidos directamente con estas especies. Una posible explicación para estas discrepancias podría ser que los péptidos establezcan interacciones con la superficie de las LDL, y que estas interacciones podrían inducir cambios conformacionales de los péptidos, exponiendo ciertos residuos de manera diferente a como lo hacen en solución. En estudios futuros *in silico*, se evaluará la posibilidad de realizar simulaciones de los péptidos en entornos similares a la superficie de las LDL.

## CONCLUSIONES

En este capítulo se estudió la capacidad de los péptidos de amaranto generados por la digestión gastrointestinal simulada para inhibir o retardar la oxidación de partículas de LDL inducida por  $\text{Cu}^{+2}/\text{H}_2\text{O}_2$ .

*El digerido completo de aislado de amaranto (Ad) fue capaz de retardar el inicio y disminuir la velocidad de propagación, pero no inhibió completamente la formación de DC y compuestos fluorescentes en el rango de concentración proteica evaluada; sin embargo, la movilidad electroforética del LDL no se vio modificada.*

*La separación por filtración en gel permitió la identificación de las fracciones más activas (0,52-1,25 kDa), logrando una inhibición completa de DC, prevención parcial o total de la formación de compuestos de fluorescencia y cambios electroforéticos con concentraciones de péptidos similares a las utilizadas para Ad. Dentro de este grupo de fracciones, las que presentaron la mayor capacidad de prevenir los distintos cambios oxidativos de las LDL, fueron aquellas compuestas por una variedad de moléculas tanto con carácter hidrofílico como hidrofóbico.*

*Se evaluó la actividad de péptidos sintéticos derivados de la digestión gastrointestinal de Ad. Los péptidos más activos (P7, P3 y P10), que lograron prevenir la oxidación y la modificación proteica de las LDL, fueron péptidos catiónicos o neutros, con presencia de histidina, lisina, residuos aromáticos y/o residuos hidrofóbicos.*

*Puede concluirse que no hay correlación directa entre los métodos de determinación de la actividad antioxidante en sistemas químicos en solución (como por ejemplo ORAC y HORAC) y la actividad frente a un sistema complejo, multi-macromolecular y en dispersión como son las LDL. En estos sistemas, posiblemente otros factores relacionados con la concentración, posibilidad de interacción y cambios conformacionales, podrían ser determinantes para la actividad de los péptidos.*

*Los presentes resultados sugieren que, después del proceso de digestión gastrointestinal, las proteínas de amaranto ingeridas podrían producir péptidos con la capacidad de prevenir la oxidación de LDL in vivo. De acuerdo con sus características fisicoquímicas, diferentes péptidos podrían actuar por diferentes mecanismos y/o en diferentes entornos (masa de agua, interfase agua-lípido) evitando la oxidación de lípidos y/o proteínas del LDL. Finalmente y teniendo en cuenta que este tipo de acciones deberían ocurrir en el interior del organismo, por ejemplo en el espacio subendotelial de los vasos sanguíneos como se describió en la introducción de este Capítulo, es fundamental la absorción de los péptidos a nivel intestinal. Este aspecto será*

*estudiado en el Capítulo 4.*

## **CAPITULO 3.**

### **ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE INTRACELULAR**



### **Estrés oxidativo intracelular**

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) tienen participación en la modulación de una variedad de eventos de señalización celular que afectan a importantes funciones fisiológicas. Entre las ROS, los radicales hidroxilo ( $\text{OH}\cdot$ ) se generan con frecuencia en condiciones fisiológicas y patológicas y están estrechamente vinculados con varios modelos de patologías relacionadas con el estrés oxidativo y su efecto sobre las biomoléculas celulares. En particular, la aparición de estrés oxidativo debido a una mayor producción de ROS o desequilibrios en el potencial redox del cuerpo es un sello distintivo de las enfermedades inflamatorias crónicas, incluido el cáncer (Mendis y col., 2007).

Las especies reactivas del oxígeno (ROS) generadas durante las condiciones de estrés oxidativo causan un efecto adverso en las células, como la oxidación de las moléculas biológicas presentes. Por lo tanto, la producción de ROS debe estar estrictamente regulada. Esta regulación se logra mediante los sistemas antioxidantes en el cuerpo humano, que mantienen el equilibrio entre oxidantes y antioxidantes. Si el equilibrio entre especies oxidantes y antioxidantes se ve alterado por el estrés oxidativo crónico se necesitan antioxidantes suplementarios para mediar el equilibrio oxidativo, a fin de proteger a las células frente a este proceso (Himaya y col., 2012).

La mayor fuente de radicales libres es nuestro propio organismo; su formación ocurre continuamente en las células como consecuencia de reacciones enzimáticas y no enzimáticas. Las reacciones enzimáticas, que sirven como fuentes de radicales libres, incluyen aquellas involucradas en la cadena respiratoria mitocondrial, el sistema citocromo P450 en el retículo endoplasmático, reacciones oxidativas en los peroxisomas y durante la fagocitosis, así como reacciones catalizadas por iones de metales de transición (Santo y col., 2016).

- **Mitocondria**

Las mitocondrias son la principal fuente de ATP en animales y usan más del 80 % del  $\text{O}_2$  que respiramos. Estas organelas juegan también un papel clave en otros procesos tales como el manejo del  $\text{Ca}^{2+}$  y los mecanismos de muerte celular. Se sabe que estas organelas forman una red interconectada compleja y dinámica sujeta a procesos de fisión y fusión constantes según las necesidades celulares. En efecto, los procesos de aislamiento que separan artificialmente a las mitocondrias de esta red pueden cambiar sus propiedades. El proceso de fusión puede ayudar a mitigar, por ejemplo, el daño mitocondrial mezclando el contenido de las mitocondrias dañadas con las nuevas. Las mitocondrias dañadas pueden eliminarse *in vivo* mediante autofagia, mientras que la fisión crea nuevas mitocondrias y en el proceso puede agrupar el daño en aquellas mitocondrias que se seleccionan para autofagia (Halliwell y Gutteridge, 2015).

Como se mencionó anteriormente, la mayoría de las ROS son productos de la respiración mitocondrial. Aproximadamente el 1-2% del  $\text{O}_2$  consumido durante la respiración fisiológica normal se convierte en el radical superóxido  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , precursor de la mayoría de las ROS. La producción de

$O_2^{\bullet -}$  ocurre principalmente en el Complejo I y III de la cadena respiratoria tanto en la matriz mitocondrial como en el espacio intermembrana. El  $O_2^{\bullet -}$ , un radical bastante inestable, es relativamente incapaz de difundir a través de la membrana mitocondrial hacia otros compartimentos celulares por lo que afecta diferentes estructuras y funciones en la misma mitocondria (lípidos, proteínas y ADN). También es convertido rápidamente en  $H_2O_2$ , el principal mediador celular del estrés oxidativo, de forma espontánea o enzimática, con la ayuda de la superóxido dismutasa. La estabilidad relativa y la permeabilidad a través de la membrana del  $H_2O_2$  le permiten difundir libremente por toda la célula pudiendo interactuar con el  $O_2^{\bullet -}$  en una reacción de Haber-Weiss o sufrir su escisión impulsada por  $Fe^{2+}$  o  $Cu^{2+}$ , en una reacción de Fenton, generando el radical  $OH^{\bullet}$  altamente reactivo (Ott y col., 2007, Shokolenko y col., 2009, Santo y col., 2016). Además del papel bien establecido de las mitocondrias en el metabolismo energético, la regulación de la muerte celular ha surgido como una segunda función principal de esta organela. Esto, a su vez, parece estar íntimamente ligado a su papel como principal fuente intracelular de especies reactivas de oxígeno (ROS). De acuerdo con una estimación, la concentración en el estado estacionario de  $O_2^{\bullet -}$  en la matriz mitocondrial es aproximadamente de 5 a 10 veces mayor que en el citosol o el núcleo. La interacción de diversas macromoléculas con ROS puede perjudicar la función de esta organela y puede influir directamente en la viabilidad celular y desencadenar inclusive la muerte celular (Ott y col., 2007).

*Daño al ADN:* La producción mitocondrial de ROS conduce a daño del ADN mitocondrial ( $ADN_{mt}$ ) lo que constituye la base de la teoría del envejecimiento por los radicales libres mitocondriales. De acuerdo con esta teoría, la producción de ROS por parte de las mitocondrias conduce a daños en el ADN y mutaciones que llevan a una disfunción progresiva de la cadena respiratoria y a un aumento adicional en la producción de ROS como consecuencia de esta disfunción. La escalada exponencial de estos procesos es un “círculo vicioso” y el aumento de las mutaciones del  $ADN_{mt}$  y las ROS finalmente alcanzan niveles que son incompatibles con la vida (Harman, 1972; Shokolenko y col., 2009; Mikhed y col., 2015)). El  $ADN_{mt}$  codifica trece polipéptidos, veintidós ARNs de transferencia ( $ARN_t$ ) y dos ARNs ribosómicos ( $ARN_r$ ), todos son esenciales para el transporte de electrones y la generación de ATP por fosforilación oxidativa (Halliwell y Gutteridge, 2015). El  $ADN_{mt}$ , por lo tanto, representa un objetivo celular crítico para el daño oxidativo que podría conducir a una lesión celular letal a través de la disfunción en estos procesos. Es especialmente susceptible al ataque de ROS debido a la proximidad a la cadena de transporte de electrones, la región principal para la producción de radicales libres, y la falta de histonas protectoras. El nivel de bases oxidativamente modificadas en el  $ADN_{mt}$  es de 10 a 20 veces mayor que en el ADN nuclear. Se ha postulado que esta inestabilidad del  $ADN_{mt}$  es uno de los factores más importantes en el envejecimiento (Barja, 2005, Ott y col., 2007).

*Daño a las proteínas:* Un mecanismo importante de toxicidad de  $O_2^{\bullet -}$  es la oxidación e inactivación directa de las proteínas hierro-azufre [Fe-S]. Un ejemplo de esto es lo que ocurre con la enzima aconitasa de la matriz mitocondrial que participa en el ciclo de Krebs catalizando la isomerización

de citrato a isocitrato, y la liberación de hierro asociada a este proceso (Cantu y col., 2009). Esta enzima es especialmente sensible a la inactivación oxidativa mediada por  $O_2^{\bullet-}$  debido a la presencia de un solo átomo de hierro no ligado, de modo que la oxidación de su centro [Fe-S] promueve la inestabilidad del grupo y la consiguiente pérdida del átomo de hierro lábil y la formación de  $H_2O_2$ , reactivos de las reacciones de Haber-Weiss y Fenton que puede dar como resultado la generación del radical hidroxilo, lo que permite la amplificación del daño oxidativo inducido por  $O_2^{\bullet-}$ . Por otro lado, la inhibición de la acotinas, incluso parcial, podría provocar una disfunción del ciclo de Krebs y tener un impacto en la producción de energía y la viabilidad celular. Además de la acotinas mitocondrial el radical de  $O_2^{\bullet-}$  es capaz de afectar las actividades de otras enzimas de hierro-azufre como la NADH-deshidrogenasa mitocondrial, la NADH-oxidas y la ATPasa (Cadenas y col., 2000).

*Daño a los lípidos:* La formación de ROS y la estimulación de la peroxidación lipídica en las mitocondrias pueden llevar a la supresión del metabolismo mitocondrial. Los productos de peroxidación lipídica mitocondrial pueden alterar la función de barrera de las membranas al interactuar directa y/o indirectamente con las regiones lipídicas o con la proteína de la membrana. Si no son neutralizados por los antioxidantes endógenos, los peróxidos lipídicos se fragmentan y se descomponen para formar aldehídos altamente reactivos capaces de difundir fácilmente a través de las membranas y amplificar el daño. De esta forma, se ven afectadas las funciones mitocondriales vitales, como la respiración y la fosforilación oxidativa, las propiedades de barrera de la membrana interna, el mantenimiento del potencial de membrana mitocondrial y la capacidad de amortiguamiento de  $Ca^{2+}$  mitocondrial. Un efecto ampliamente estudiado de la producción de ROS en las mitocondrias es el cambio de permeabilidad mitocondrial dependiente de  $Ca^{2+}$  que desempeña un papel clave en ciertos tipos de muerte celular. La permeabilización no selectiva de la membrana mitocondrial interna que se promueve mediante la acumulación de cantidades excesivas de iones  $Ca^{2+}$  es estimulada por una variedad de compuestos entre los que se encuentran los productos de oxidación lipídica mitocondriales (Kowaltowski y col., 2001, Anderson y col., 2013).

- **Retículo endoplasmático**

El retículo endoplasmático (RE) es una organela unida a la membrana cuyas funciones principales están relacionadas al plegamiento y las modificaciones postraduccionales de proteínas. También juega un papel importante en la biosíntesis de lípidos, la desintoxicación, el metabolismo energético, la homeostasis del  $Ca^{2+}$  intracelular y el balance redox (Cao y Kaufman, 2014). En cuanto a la generación de ROS pueden mencionarse las enzimas oxidasas de función mixta del citocromo P450 presentes en el RE implicadas en la oxidación de una amplia gama de sustratos a expensas del  $O_2$  con la consecuente generación de  $O_2^{\bullet-}$ . Por otro lado, el mecanismo que utilizan las células para plegar proteínas en el RE también puede contribuir a la generación de ROS, ya que durante dicho plegamiento los grupos tiol de las cisteínas se oxidan y forman enlaces disulfuro generando  $H_2O_2$  como subproducto (Cao y Kaufman, 2014).

- **Peroxisomas**

El hecho de que en estas organelas subcelulares exista colocación de catalasa (la actividad de esta enzima en las células animales se localiza casi completamente en estas organelas) y oxidasas relacionadas con vías metabólicas en las cuales varias moléculas orgánicas se descomponen para producir  $H_2O_2$ , es un importante indicio de su papel en el metabolismo de las ROS (Halliwell y Gutteridge, 2015). Participan no solo en la generación de ROS sino también en la defensa celular mediante el secuestro de radicales. La principal vía asociada a la generación de ROS es la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos en la cual los electrones eliminados reducen el  $O_2$  a  $H_2O_2$  (que luego se descompone en  $O_2$  y  $H_2O$  por la actividad de la catalasa). A diferencia de lo que ocurre con la  $\beta$ -oxidación mitocondrial esta vía no está acoplada a la fosforilación oxidativa, y no conduce a la producción de ATP; la energía libre que se produce es liberada en forma de calor. Entre las enzimas relacionadas con la generación de ROS podemos nombrar la acil-coA oxidasa, la urato-oxidasa y la xantina-oxidasa, mientras que entre las enzimas encargadas de degradar las ROS, además de la catalasa, se encuentran la glutatión peroxidasa, la superóxido dismutasa dependiente de Mn (MnSOD) y la superóxido dismutasa dependiente de Zn y Cu (Sacanelles Salceda, 2008, Schrader y Fahimi, 2006).

- **Fagocitosis**

La fagocitosis que ocurre en los neutrófilos y macrófagos se asocia con lo que se conoce como “estallido oxidativo”. Durante este proceso se liberan grandes cantidades de ROS con el objetivo de atacar a las bacterias fagocitadas. Una enzima clave en este proceso es la NADPH oxidasa (NOX). Si bien, este es un ejemplo de las ROS llevando a cabo funciones biológicas importantes, en este caso como mecanismo de defensa, se han descrito varias condiciones patológicas asociadas con la producción de ROS por parte de las enzimas NOX (Lambeth, 2007).

- **Metales de transición**

La generación de radicales libres en la célula está estrechamente relacionada con reacciones catalizadas por metales. El estado redox de la célula está vinculado en gran medida a los pares redox de Fe y Cu y se mantiene dentro de límites fisiológicos estrictos. Si bien la regulación del hierro garantiza que no esté libre en la célula (se encuentra unido a distintas moléculas, principalmente proteínas) en condiciones de estrés, un exceso de  $O_2^{\cdot -}$  es capaz de generar “hierro libre” a partir de las moléculas que lo contienen. Como se mencionó previamente, la liberación de hierro por  $O_2^{\cdot -}$  se ha demostrado para enzimas que contienen clusters  $[4Fe-4S]$ , proceso que puede causar inactivación enzimática. Estos procesos generan  $Fe^{+2}$  libre que entonces es capaz de participar en la reacción de Fenton junto con el  $H_2O_2$  para generar  $OH^{\cdot}$  (Valko y col., 2006). De forma similar, el cobre puede colaborar con la inducción del estrés oxidativo celular por dos mecanismos: puede catalizar directamente la formación de ROS a través de una reacción tipo Fenton, y se ha demostrado que la exposición a niveles elevados de cobre disminuye significativamente los niveles de glutatión reducido (Jomova y Valko, 2011).

## **Daño celular por agentes oxidativos exógenos**

El daño celular debido a ROS no solo deriva de procesos endógenos; existen muchos agentes exógenos que pueden llegar a la célula y generar daño oxidativo. Un ejemplo es el humo de cigarrillo que contiene muchos oxidantes y radicales libres como el  $O_2^{\cdot-}$  y el NO capaces de inducir daño celular y cáncer (Pryor, 1997). La exposición al ozono, que es un importante contaminante ambiental, también puede causar un estado de estrés oxidativo que se ha relacionado con varias enfermedades neurodegenerativas (Rivas-Arancibia y col., 2009). Otro ejemplo es la hiperoxia, que ocurre cuando hay niveles de oxígeno más altos que la presión parcial normal de oxígeno en los pulmones u otros tejidos corporales; los estados de hiperoxia conducen a una mayor producción de ROS y RNS (Gordo-Vidal y col., 2010). Se ha demostrado que la radiación ionizante en presencia de  $O_2$ , convierte el radical hidroxilo, el superóxido y los radicales orgánicos en peróxido de hidrógeno e hidroperóxidos orgánicos lo que genera un estado de estrés oxidativo celular (Birben y col., 2012). Por otra parte, la mucosa intestinal se encuentra constantemente expuesta a oxidantes, mutágenos y carcinógenos provenientes de la dieta. A pesar de la existencia de estos sistemas de defensa, puede producirse estrés oxidativo y desbalance redox en presencia, por ejemplo, de las concentraciones de peróxidos lipídicos comúnmente encontrados en alimentos cocidos en grasas o aceites, lo cual genera efectos sobre la homeostasis metabólica intestinal (Aw, 1999).

## **Sistemas de defensa antioxidante celulares**

Tiempo atrás, la definición de antioxidantes en los sistemas biológicos se refería a cualquier sustancia que, cuando está presente en bajas concentraciones en comparación con las de un sustrato oxidable, retrasa o previene la oxidación de ese sustrato (Halliwell, 1990). Si bien esta definición hace referencia a todos los sustratos oxidables que están presentes en las células (lípidos, proteínas, ADN y carbohidratos) no se relaciona con los mecanismos antioxidantes intracelulares.

Cuando se produce un estado de estrés oxidativo, las células intentan contrarrestar los efectos oxidantes y restablecer el equilibrio redox mediante la activación o el silenciamiento de los genes que codifican enzimas de la defensa antioxidante intracelular, factores de transcripción y proteínas estructurales. Por otro lado, la concentración de glutatión reducido (GSH) así como la relación entre éste y el glutatión oxidado (GSSG) son factores determinantes del estrés oxidativo a nivel celular y del organismo (Scandalios, 2004).

Los antioxidantes pueden ejercer su actividad celular de forma directa y/o indirecta. La capacidad antioxidante directa es la capacidad del antioxidante para eliminar ROS mediante la donación de hidrógeno o electrones, mientras que la capacidad antioxidante indirecta es la capacidad de una sustancia para prevenir el estrés oxidativo al inducir la expresión de las enzimas desintoxicantes/antioxidantes de fase II (catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa GPx, glutatión reductasa (GR),  $\gamma$ -glutamato-cisteína-ligasa ( $\gamma$ -GCL), glutatión S-

transferasa (GST), NADPH quinona oxidoreductasa (NQO-1), hemo oxygenasa 1 (HO-1). Estas enzimas pueden eliminar los radicales libres de forma individual o sinérgica y proteger la integridad de las células. Por lo tanto, los cambios en las actividades de estas enzimas antioxidantes pueden considerarse biomarcadores de la respuesta antioxidante (Wu y col., 2017). Es por esto que ha surgido un concepto mucho más amplio de antioxidante que abarca su capacidad de modular el estado redox celular incluyendo su efecto sobre sistemas de reparación, enzimas antioxidantes, factores que afectan la homeostasis vascular, transducción de señales y expresión génica (Frankel y Meyer, 2000).

Las moléculas que constituyen la barrera de defensa antioxidante celular actúan en diferentes niveles: previniendo la formación de ROS, eliminando ROS y reparando daños inducidos por ROS. Sobre esta base, los antioxidantes se pueden clasificar como antioxidantes de primera, segunda o tercera línea.

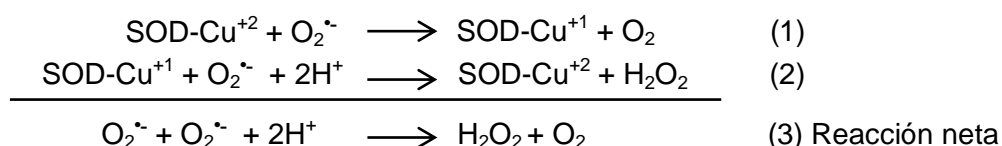
#### *Antioxidantes de primera línea*

Se trata de un grupo de antioxidantes que actúan suprimiendo o previniendo la formación de radicales libres o especies reactivas en las células. Son muy eficientes en neutralizar cualquier molécula con el potencial de convertirse en un radical libre o cualquier radical libre con la capacidad de inducir la producción de otros radicales. Las tres enzimas clave de este grupo son la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa. También se incluyen proteínas de unión a iones metálicos como transferrina y ceruloplasmina que quelan o sequestran hierro y cobre, respectivamente.

- *Superoxido dismutasa (SOD)*

Esta familia de enzimas es altamente eficiente en la eliminación del radical superóxido  $O_2^{\cdot-}$  generado durante el metabolismo celular. En las células animales se encuentran mayormente en el citosol, pero también están en los lisosomas, el núcleo y el espacio entre las membranas mitocondriales internas y externas (Halliwell y Gutteridge, 2015). También se ha informado su presencia en los peroxisomas. Si bien se han descubierto varios metales asociados a estas enzimas, en las células eucariotas la mayoría son dependientes de Cu para su actividad catalítica y también poseen Zn (Robinett, y col., 2018).

Esta enzima elimina el radical  $O_2^{\cdot-}$  con una eficacia catalítica muy alta en una reacción de dos pasos:



La velocidad de la reacción aumenta a medida que aumenta el pH.

La enzima SOD es la primera enzima de desintoxicación y el antioxidante más potente de la célula. Se ha observado asociación entre la deficiencia de SOD y una serie de patologías tanto en animales como en humanos. La enzima es indispensable para la salud celular, ya que protege a

las células del daño oxidativo que promueve el envejecimiento o la muerte celular. Los niveles de SOD disminuyen con la edad, mientras que la formación de radicales libres aumenta (Ighodaro y Akinloye, 2017).

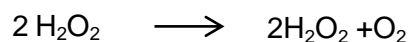
- *Glutation peroxidasa (GPx)*

La GPx tiene como función remover el  $\text{H}_2\text{O}_2$  y los hidroperóxidos orgánicos reduciéndolos a agua o al alcohol correspondiente. Esta reacción está acoplada a la oxidación del glutatión (GSH). Estas enzimas pertenecen a una familia filogenéticamente relacionada. En los mamíferos, las más estudiadas son cuatro isoenzimas que contienen selenocisteína en su centro activo, aunque actualmente se sabe que existe un segundo grupo dependiente de cisteína únicamente (Miyamoto y col., 2003). Estas cuatro isoenzimas se localizan en distintos tejidos y en distintos compartimentos celulares lo cual está estrechamente relacionado con la función antioxidante que cumplen. La GPx1, que se ubica principalmente en el citosol aunque también está presente en la mitocondria y en los peroxisomas de algunos tejidos, es la más conocida y se relaciona con la prevención de la apoptosis inducida por el estrés oxidativo y otros estímulos. La GPx2 está presente principalmente en el epitelio intestinal donde su función parece estar relacionada con el metabolismo de los peróxidos lipídicos ingeridos o generados durante la oxidación de lípidos en el intestino; también está presente en hígado (Halliwell y Gutteridge, 2015). La GPx3 se ubica en el plasma y se ha detectado en algunos fluidos extracelulares. Estas tres isoenzimas trabajan en la fase acuosa, mientras que existe una cuarta, la GPx4 que cuya función está más relacionada con la protección de las membranas frente al estrés oxidativo (Brigelius-Flohé y Maiorino, 2013) ya que es capaz de reducir hidroperóxidos de fosfolípidos integrados en las membranas. Como se mencionó, el Se está presente en los sitios activos de estas enzimas como selenocisteína; en la cisteína el átomo de azufre se reemplaza por Se (R-SeH). La presencia de Se reduce el pKa (~8,3 para -SH y 5,2 para SeH) y por lo tanto favorece la ionización a  $\text{Se}^-$ . El conjunto de reacciones catalizadas por la GPx y acopladas al glutatión se muestra a continuación:



- *Catalasa (CAT)*

En condiciones fisiológicas, la defensa primaria contra el  $\text{O}_2^{\cdot-}$  y el  $\text{H}_2\text{O}_2$  en las mitocondrias que no contienen catalasa se realiza mediante la acción de la SOD y la GPx mencionadas anteriormente. Sin embargo, a pesar de la actividad altamente eficiente de estas enzimas, pueden difundir cantidades significativas de  $\text{H}_2\text{O}_2$  desde las mitocondrias hasta el citosol, donde se produce la desintoxicación a través de la GPx presente en el citosol o por la catalasa presente principalmente en los peroxisomas. Hay evidencia de que tanto en los cardiomiocitos como en los hepatocitos de rata hay presente catalasa asociada a mitocondrias (Radi y col., 1991 y Salvi y col., 2007). A diferencia de la GPx, la CAT cataliza la descomposición del  $\text{H}_2\text{O}_2$  directamente a  $\text{O}_2$ :



En condiciones de alta presencia de ROS celulares, por ejemplo en condiciones patológicas como la inflamación y la hiperoxia, la catalasa se convierte en el eliminador más importante de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en el citosol. La CAT de animales contiene cuatro subunidades, cada una de las cuales tiene  $\text{Fe}^{+3}$  en su sitio activo. En los animales, si bien esta enzima está presente en todos los órganos, está en mayor concentración en el hígado. En los eritrocitos, esta enzima ayuda a la protección contra el  $\text{H}_2\text{O}_2$  generado por la dismutación del  $\text{O}_2^{\cdot-}$  producto de la autooxidación de hemoglobina. Como el  $\text{H}_2\text{O}_2$  atraviesa las membranas con bastante facilidad, los eritrocitos (y otras células en la sangre) pueden proteger a los otros tejidos contra el  $\text{H}_2\text{O}_2$  extracelular al "absorberlo" y destruirlo. Este fenómeno también puede ocurrir en cultivo celulares; el  $\text{H}_2\text{O}_2$  liberado por algunas células puede ser catabolizado por otras, especialmente a altas densidades celulares (Halliwell y Gutteridge, 2015).

- **Glutation transferasa**

Se trata de otra familia de enzimas antioxidantes. Estas inactivan los metabolitos secundarios, como aldehídos, epóxidos e hidroperóxidos no saturados. Se han descrito tres familias principales de GST: GST citosólica, GST mitocondrial y GST microsomal asociada a la membrana que tiene un papel en el metabolismo del GSH (Birben y col., 2012).

#### *Antioxidantes de segunda línea*

La función de este grupo de antioxidantes es eliminar los radicales activos para inhibir el inicio de la cadena de oxidación y/o romper las reacciones de propagación de la oxidación (Lobo y col., 2010). Cumplen su función de neutralizar o eliminar los radicales libres donándoles electrones y en el proceso se convierten en radicales libres en sí mismos que son menos dañinos y pueden ser fácilmente neutralizados. También son capaces de donar un átomo de H. Se conocen varios antioxidantes endógenos pertenecientes a este grupo que eliminan los radicales: algunos son hidrofílicos como la vitamina C, el ácido úrico y el glutatión y otros son hidrofóbicos como la vitamina E y el ubiquinol (Ighodaro y Akinloye, 2017).

- **Glutación (GSH)**

El GSH es un tripéptido compuesto por cisteína, glicina y glutamato muy abundante en todos los compartimentos celulares y es el principal antioxidante hidrosoluble endógeno (Mytilineou y col., 2002). Está involucrado en muchos aspectos de la función celular: tiene un papel importante en el metabolismo las vitaminas C y E participando en la conversión de estas a sus formas activas; también participa en el mantenimiento de la comunicación entre células a través de las uniones y en la prevención de la oxidación de los grupos  $-\text{SH}$  de las proteínas y el cross-linking (Halliwell y Gutteridge, 2015); se sabe que es un agente radioprotector, puede estar involucrado en el suministro de cobre a la enzima CuZnSOD y por último, es un cofactor para varias enzimas, incluyendo la glutatión peroxidasa. En referencia a esto es muy común hablar del sistema de glutatión, definición que incluye al glutatión y a las enzimas glutatión reductasa, glutatión



peroxidasa y glutatión S-transferasa. Este sistema se encuentra en animales, plantas y microorganismos (Lobo y col., 2010). GSH es muy abundante en todos los compartimentos celulares y es el principal antioxidante soluble. La relación GSH/GSSG es un determinante importante del estrés oxidativo (Birben y col., 2012).

#### *Antioxidantes de tercera línea*

En esta categoría se encuentran aquellos antioxidantes que ejercen su acción después de producido el daño por los radicales libres. Pertenecen a este grupo las enzimas *de novo* que reparan el daño causado a las biomoléculas celulares, ADN, proteínas y lípidos y pueden incluso reparar la membrana celular dañada. También hacen una especie de "limpieza", reconociendo, descomponiendo y eliminando biomoléculas dañadas para evitar su acumulación lo que puede ser tóxico para los tejidos corporales (Irshad y Chaudhuri, 2002). Ejemplos incluyen los sistemas de enzimas reparadoras de ADN (polimerasas, glicosilasas y nucleasas) y enzimas proteolíticas (proteinasas, proteasas y peptidasas) que se encuentran tanto en citosol como en mitocondrias de células de mamíferos.

### **Evaluación de la actividad antioxidante en cultivos celulares**

Como ya se ha mencionado, existen tres niveles generales de ensayos para la evaluación de la actividad antioxidante: ensayos químicos (acelulares) *in vitro* (como los utilizados previamente en nuestro laboratorio: ABTS, ORAC, HORAC, neutralización de peroxinitritos o superóxido, entre otros); ensayos utilizando cultivos celulares y ensayos *in vivo* en modelo animal/humano. Con base en la ventaja de su bajo costo y su operación simple y rápida, el ensayo químico es el más utilizado. Sin embargo, los resultados obtenidos en este tipo de ensayos son considerados un primer paso en la caracterización de una sustancia potencialmente antioxidante y pueden ser, además, cuestionables para predecir la capacidad antioxidante *in vivo* ya que el ensayo químico se realiza bajo condiciones no fisiológicas y no se considera la absorción y el metabolismo del compuesto antioxidante (Frankel y Meyer, 2000). En el caso de modelos animal/humano, a pesar del verdadero reflejo de la capacidad antioxidante *in vivo*, la desventaja de un largo tiempo de operación y un gran costo, así como cuestiones éticas, hace que este ensayo sea inadecuado para la evaluación de antioxidantes en la etapa inicial de la investigación antioxidante. Por lo tanto, el ensayo basado en células como método de prueba intermedio resulta necesario e imprescindible. En este sentido, existe una gran variedad de cultivos celulares capaces de ser utilizados como modelos en el estudio de los antioxidantes.

#### **Cultivo celular**

Cuando hablamos de cultivo celular nos referimos a la obtención de células de un animal o planta y su posterior crecimiento en un entorno artificial favorable (Uysal y col., 2018). Las células pueden obtenerse del tejido directamente y desagregarse por medios enzimáticos o mecánicos antes del cultivo, o pueden derivarse de una línea celular o cepa celular que ya se ha establecido. Actualmente se entiende por cultivo celular al conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento

de las células *in vitro*, preservando al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas.

- Cultivo primario

El cultivo primario de células es el primer cultivo de células en estado sintético. Las células son aisladas directamente de tejidos y órganos por disgregación mecánica o química o por digestión enzimática y proliferan en las condiciones apropiadas obteniéndose sistemas heterogéneos y de baja velocidad de crecimiento. Estos cultivos son los mejores modelos experimentales para estudios *in vitro* ya que constituyen la mejor representación de la forma y características de las células de los tejidos. Por otro lado, son difíciles de obtener y tienen una vida útil limitada (Verma, 2014). Este tipo de cultivo puede ser de dos tipos:

- ◇ En monocapa: Las células crecen adheridas sobre un soporte sólido (plástico o vidrio). El anclaje al sustrato es un prerrequisito para la proliferación celular. Es el método utilizado para la mayoría de las células.
- ◇ En suspensión: las células se encuentran dispersas en el medio de cultivo. Su crecimiento no depende del anclaje. Alcanzan la confluencia cuando el número de células es grande y los nutrientes son insuficientes.

- Líneas celulares

Cuando las células de un cultivo primario son capaces de proliferar, la población celular crece notablemente hasta que ocupan toda la superficie y sustrato disponibles alcanzando un estado de confluencia. En esta etapa, las células establecen contactos entre ellas que inhiben su proliferación y el crecimiento se detiene por lo que tienen que subcultivarse (es decir, pasarse) transfiriéndolas a un nuevo recipiente con medio de crecimiento nuevo para proporcionar más espacio para el crecimiento continuo. El proceso de subcultivo a partir de un cultivo primario puede generar lo que se conoce como línea celular (Freshney, 2006).

#### *Líneas celulares finitas y continuas*

Las líneas celulares derivadas de cultivos primarios tienen una vida útil limitada y a medida que se repican predominan las células con la mayor capacidad de crecimiento, dando como resultado un grado de uniformidad genotípica y fenotípica en la población. Normalmente, estas células crecen lentamente (tiempo de generación de 24 a 96 horas) y tienen una vida finita que, según el tipo de célula, se puede prolongar entre 20 y 100 generaciones. Superado ese límite, las células entran en una etapa que se denomina senescencia en la que pierden su capacidad de proliferar (probablemente por el acortamiento de los telómeros) y mueren. Sin embargo, algunas células (como las de roedores y las tumorales) evitan la senescencia y dan lugar a líneas celulares continuas, que crecen indefinidamente. Estas células pueden surgir de forma espontánea (exposición a radiaciones ionizantes o a carcinógenos químicos) o inducida (infección vírica o transfección de ADN) y son el resultado de un cambio genotípico denominado transformación. Estas células se dividen rápidamente con un tiempo de generación de 12 a 14 horas, tienen un potencial para ser subcultivadas indefinidamente y además son fáciles de manipular y mantener.

Sin embargo, estas líneas celulares tienen una tendencia a cambiar luego de un período de tiempo (Verma, 2014).

- Aplicaciones de los cultivos celulares

Actualmente existe una gran variedad de áreas de investigación relacionadas con la biología celular en las que se utilizan cultivos celulares. Estos se han constituido como sistemas modelo para una amplia variedad de estudios. En la investigación básica permiten estudiar procesos relacionados con mecanismos del ciclo celular, función celular especializada, interacciones célula-célula y célula-matriz. Por otro lado, en la investigación aplicada, las técnicas de cultivo celular se utilizan en áreas tan diversas como: toxicología, biotecnología, aplicaciones médicas, obtención de productos biológicos como vacunas y hormonas, inmunología, farmacología y virología entre otras (Verma, 2014).

### ***Modelos celulares en el estudio de la capacidad antioxidante***

Actualmente, la utilización de cultivos celulares para la evaluación del estrés oxidativo y la capacidad de distintos compuestos de actuar como antioxidantes está ampliamente desarrollada. Dado que para ensayos relacionados con el estrés oxidativo se busca que el modelo celular sea lo suficientemente robusto como para generar una respuesta al proceso y que solo haya efectos citotóxicos cuando los tratamientos sean muy intensos, es más ventajosa la utilización de líneas celulares en lugar de un cultivo (Goya y col., 2009). Entre los modelos celulares más usados se encuentran:

*Eritrocitos:* Debido a su papel como transportador de  $O_2$  y  $CO_2$  y su alto contenido de Fe, los glóbulos rojos están en constante exposición a ROS y a estrés oxidativo. Por este motivo, estas células cuentan con sistemas antioxidantes altamente efectivos (Pandey y Rizvi, 2011) y constituyen un modelo confiable para el estudio del estrés oxidativo. Los glóbulos rojos son altamente susceptibles al daño oxidativo inducido por radicales libres, particularmente en la membrana celular mediante la oxidación tanto de lípidos como de proteínas. Este daño oxidativo de la membrana puede causar hemólisis (Niki y col., 1988). De hecho, la hemólisis oxidativa de los glóbulos rojos sirve como un buen sistema modelo para evaluar compuestos desde el punto de vista de su comportamiento como antioxidantes o prooxidantes (Banerjee y col., 2008).

*Línea celular de feocromocitoma (PC-12):* Se trata de una línea celular clonal derivada de un feocromocitoma de rata que expresa muchas propiedades que lo hacen útil como modelo celular (Zhang y col., 2017). Se han utilizado ampliamente en los últimos años como modelo para estudiar el estrés oxidativo en las células neuronales y se usa comúnmente en la investigación de enfermedades neurodegenerativas, como el Alzheimer y el Parkinson (Bao y col., 2017)

*Línea celular de hepatoma humano HepG2:* Tanto el hígado como el tracto gastrointestinal son portales de entrada para xenobióticos por lo que están constantemente expuestos a múltiples sustancias químicas y son propensos al daño oxidativo inducido por diferentes tipos de compuestos oxidantes. Como consecuencia de esto, el desequilibrio entre la formación de ROS y la capacidad antioxidante en hígado y colon se ha relacionado con un mayor riesgo de

enfermedades crónicas y cáncer en estos órganos (Deferme y col., 2015). Por ejemplo, se ha demostrado que en los pacientes con enfermedades inflamatorias del intestino este proceso está acompañado por una alta producción de ROS intracelulares capaces de interactuar con genes implicados en vías carcinogénicas (Itzkowitz y Yio, 2004). Estas dos líneas celulares responden al estrés oxidativo al activar mecanismos antioxidantes (Deferme y col., 2015), además son capaces de llevar a cabo la biotransformación de xenobióticos y son permeables a diferentes tipos de compuestos por lo que son una alternativa conveniente y reproducible.

Dado que el hígado es uno de los principales “objetivos” de los antioxidantes una vez que son absorbidos por el tracto gastrointestinal y que es fundamental en el metabolismo de los xenobióticos, los estudios que tratan el efecto de compuestos en el hígado son muy utilizados, siendo la línea HepG2 el modelo más empleado. La línea HepG2 humana, una línea celular transformada y bien diferenciada, es un modelo confiable de hígado humano, fácil de cultivar, bien caracterizado y ampliamente utilizado para estudios bioquímicos y nutricionales donde se pueden analizar muchos antioxidantes y condiciones con poca variabilidad entre ensayos (Goya y col., 2009).

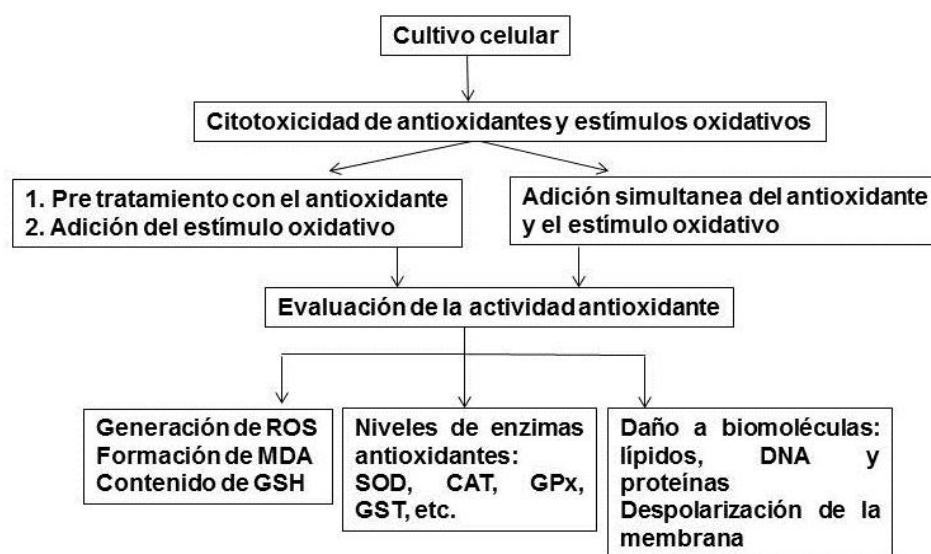
*La línea celular de adenocarcinoma de colon humano HT29:* Esta línea celular es ampliamente utilizada en el estudio de la biología del cáncer de colon y en los estudios centrados en la digestión y biodisponibilidad de alimentos debido a su capacidad de expresar las características de las células intestinales maduras. En el fenotipo diferenciado, estas células son capaces de formar una monocapa con uniones estrechas entre las células y un típico borde de cepillo apical. Además, estas células diferenciadas expresan hidrolasas asociadas al borde del cepillo típicas del intestino delgado, aunque la actividad enzimática es menor que la encontrada *in vivo* (Martínez-Maqueda y col., 2015). También se han utilizado con frecuencia para estudiar la respuesta inmune intestinal a la infección bacteriana y la supervivencia, adhesión o invasión de microorganismos.

*Línea celular de adenocarcinoma de colon humano (Caco-2):* La línea celular Caco-2 fue establecida a partir de un adenocarcinoma de colon humano (Fogh y Trempe, 1975). Estas células son capaces de diferenciarse espontáneamente en enterocitos mientras se cultivan a largo plazo. Son indiferenciadas durante toda la fase de crecimiento exponencial, y su diferenciación sólo ocurre tras alcanzar la confluencia celular, durante su fase estacionaria, exhibiendo las mismas funciones biológicas y estructura de microvellosidades que el intestino humano. Dado que la población de la línea celular Caco-2 ha demostrado ser heterogénea y altamente dependiente de las condiciones de cultivo se ha logrado aislar varios clones de esta con el objetivo de reducir la heterogeneidad. Un ejemplo de esto es el clon TC7 obtenido a partir de un pasaje tardío de la línea parental Caco-2 y que se caracteriza por una mejor capacidad metabólica y de transporte (Caro y col., 1995). Las características de esta línea celular han permitido, desde hace varios años, su utilización en la investigación científica en distintas áreas como nutrición, toxicología y farmacología evaluando el transporte y la absorción intestinal de una gran cantidad de compuestos exógenos y endógenos. Sin embargo, esta línea celular se utiliza también en otras

áreas de investigación, como por ejemplo el estudio del estrés oxidativo. Estas células sirven como un modelo efectivo debido a que poseen un sistema de defensa antioxidante muy amplio que permite la evaluación de varios biomarcadores del estrés oxidativo. Un ejemplo de esto es el factor de transcripción NRF2, un regulador clave en la respuesta al estrés oxidativo y que se expresa en colon, hígado y otros tejidos (Gonzalez-Donquiles y col., 2017). La línea celular Caco-2 y varios de sus clones se han utilizado en ensayos relacionados con el estrés oxidativo intracelular y la actividad antioxidante de una gran variedad de compuestos (Liu y Finley, 2005; Taha y col., 2010).

### ***Ensayos de actividad antioxidante en cultivos celulares***

Una de las ventajas principales de la utilización de cultivos celulares es que permite el estudio de diversos tipos de células, estímulos oxidativos y muestras, inclusive permite desarrollar modelos para evaluar el efecto de antioxidantes en enfermedades específicas. En cuanto a los antioxidantes, estos se pueden agregar al medio de cultivo celular simultáneamente con el factor estresante o preincubarse con las células. Es muy importante considerar el efecto de la incorporación del antioxidante en las células y las variables relacionadas para una evaluación sólida del efecto antioxidante. Los cultivos celulares pueden sufrir un estado de estrés oxidativo por una mayor generación de ROS o por un daño en las defensas antioxidantes; por esto, los efectos de compuestos antioxidantes contra el estrés oxidativo en estos modelos se pueden medir de distintas formas y a partir de varios biomarcadores como por ejemplo: supresión de la formación de ROS, oxidación de biomoléculas (lípidos, proteínas y ADN), efecto sobre la actividad de las enzimas antioxidantes y prooxidantes, así como sobre la expresión de genes relacionados, efecto sobre antioxidantes celulares no enzimáticos y muerte celular (Niki, 2010; López-Alarcón y Denicola, 2013). En el **Esquema 3.1** se muestra un resumen del procedimiento de evaluación de la capacidad antioxidante mediante el uso de cultivos celulares.



Esquema 3.1. Procedimiento para la evaluación de antioxidantes en modelos celulares (Niki, 2010).

El estudio de los efectos de los antioxidantes a nivel celular implica el uso de diferentes estímulos oxidativos o factores estresantes, lo que a su vez generan diferentes mecanismos de estrés oxidativo. Entre los más utilizados se encuentran:

- *AAPH*: Como se mencionó anteriormente (Capítulo 1), el AAPH (azobis- (2-amidinopropano) dihidrocloruro) es un iniciador hidrofílico de radicales; se descompone espontáneamente a 37 °C para producir nitrógeno molecular y dos radicales de carbono, R•. Estos radicales generados reaccionan rápidamente con el oxígeno para formar el radical peroxilo ROO• (Niki, 1990). La inducción de la oxidación por AAPH puede utilizarse para revelar la capacidad de una sustancia de eliminar radicales libres y permite la cuantificación del contenido de ROS, los niveles de MDA y la actividad de las enzimas antioxidantes. El AAPH se ha utilizado en una gran variedad de modelos celulares con el fin de evaluar la capacidad antioxidante de péptidos, polifenoles, curcumina, etc.
- *t-BuOOH*: El tert-butilhidroperóxido es un hidroperóxido orgánico capaz de metabolizarse a intermediarios de radicales libres por el citocromo P450 en hepatocitos o en eritrocitos, que a su vez inician la oxidación de lípidos afectando la integridad de las membranas celulares (Rush y col., 1985).
- $H_2O_2$ : Es uno de los más utilizados a la hora de inducir el estrés oxidativo en varios modelos celulares, particularmente en cultivos Caco-2. Como se mencionó anteriormente, la reacción biológicamente significativa de  $H_2O_2$  es su conversión espontánea, catalizada por  $Fe^{2+}$  (reacción de Fenton) a radicales  $OH•$  altamente reactivos. Como los alimentos que ingerimos frecuentemente contienen sales de hierro, y los agentes reductores en el jugo gástrico reducen el

hierro a  $\text{Fe}^{2+}$  para facilitar su absorción, el tracto gastrointestinal es un objetivo importante para el daño generado por los radicales  $\text{HO}\cdot$ . Altas concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  puede causar daño a la membrana celular, daño al ADN y finalmente necrosis (Wijeratne y Cuppett, 2006). Dado que las células del colon son susceptibles a la actividad oxidativa del  $\text{H}_2\text{O}_2$ , el modelo de células Caco-2 con  $\text{H}_2\text{O}_2$  como inductor es un sistema ideal para realizar estudios relacionados con el estrés oxidativo y con la identificación de antioxidantes que pueden eliminarlo o reducirlo. La respuesta de estas células varía ampliamente según la concentración de inductor utilizada.

## OBJETIVOS

### Objetivo general

El objetivo de este capítulo fue evaluar la actividad antioxidante intracelular por diferentes mecanismos de productos de la digestión gastrointestinal de aislado proteico de amaranto utilizando como modelo la línea celular Caco2-TC7.

### Objetivos específicos

- Optimizar técnicas que permitan evaluar actividad antioxidante en cultivos celulares.
- Evaluar la citotoxicidad del digerido gastrointestinal, sus fracciones FPLC y los péptidos sintéticos por diversas metodologías.
- Estudiar la capacidad antioxidante intracelular del digerido gastrointestinal, sus fracciones FPLC y los péptidos sintéticos por diversas metodologías.
- Comparar los resultados con los previamente obtenidos en sistemas químicos acelulares y analizar posibles mecanismos de acción.



## MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1 Muestras proteicas

Las muestras proteicas de amaranto utilizadas fueron las obtenidas y caracterizadas en el Capítulo 1.

- Digerido gastrointestinal simulado de aislado proteico (**Ad**)
- **Fracciones de Ad** obtenidas por cromatografía FPLC de filtración en gel.
- **Péptidos sintéticos** identificados a partir de **Ad**.

### 3.2. Cultivo de células Caco-2 TC7

#### 3.2.1. Medios y reactivos utilizados para los cultivos celulares

- Buffer fosfato salino (PBS):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,144 g/L,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,795 g/L, NaCl 9 g/L, pH = 7,4.
- Medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con 15 % de suero fetal bovino (SFB): 1 sobre de DMEM (P3030-001, EMEVE Medios de laboratorio Microvel SRL) con 4,5 g/L de glucosa, 13 mL de Penicilina/Estreptomicina (15140-122 GIBCO PenStrep x 100 ml, 1000U/Pen + 1000 ug/ml Strep), 2 g de  $\text{NaHCO}_3$ , 0,5 g de gentamicina, 13 mL de aminoácidos no esenciales (MEM Non-Essential Amino Acids, GIBCO), 180 mL de suero fetal bovino (SFB) inactivado a 65°C (Internegocios SA), 1L de agua para irrigación quirúrgica, pH final = 7,4. El medio se esterilizó por filtración con membrana (filtro GP Millipore Express Plus membrane 0,22  $\mu\text{m}$ ) y se almacenó a 4 °C.
- Tripsina: 75 mg de tripsina (25200-056 GIBCO 0,25% Trypsin EDTA 1X) y 20 mg de EDTA en 100 ml de PBS. Se esterilizó por filtración con membrana (0,22  $\mu\text{m}$ ) y se almacenó a -20 °C hasta su utilización.
- TrypLE: TrypLE Express Gibco
- Etanol 70% v/v.
- Azul tripán (T6146 SIGMA Trypan Blue powder, BioReagent, 0,4% en PBS 2X).
- Placas de cultivo Greiner Bio-One.
- Buffer PBS: NaCl 0,5 M, KCl 0,003 M,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,008 M,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,001 M, pH 7,4.

#### 3.2.2. Cultivo de las células Caco 2-TC7

Los cultivos celulares se obtuvieron a partir de células que se encontraban congeladas en crioviales a -80°C (en nitrógeno líquido). Estas células fueron descongeladas, resuspendidas en DMEM, sembradas en una botella de plástico de cultivo celular e incubadas en estufa (37°C, 5% de  $\text{CO}_2$ ) donde se mantuvieron cambiando el medio cada dos días. Cuando la monocapa llegó a confluencia (aproximadamente 7 días) el cultivo se amplificó tripsinando y sembrando las células en otra botella de 25  $\text{cm}^2$  o en una de 75  $\text{cm}^2$  según la cantidad de células obtenidas. Este procedimiento se repitió hasta obtener un recuento suficiente para las siembras en placa y para obtener botellas de reserva. Todos los ensayos se realizaron a partir de monocapas de Caco-2 TC7 en medio DMEM con 15% de SFB incubadas en placas de cultivo celular en estufa (37°C, 5%

de CO<sub>2</sub>). Las células Caco2-TC7 empleadas correspondieron a los pasajes N° 39-40 del cultivo inicialmente adquirido en la ATCC.

*Tripsinado:* Para el proceso de amplificación del cultivo; una vez que la botella llegó a confluencia, se realizó una observación macro y microscópica para verificar que no existieran contaminación ni anomalías en el cultivo. Bajo flujo laminar, se descartó el medio con pipeta estéril, se lavó con PBS y se agregó tripsina sobre la pared opuesta a la monocapa (1 mL para botellas de 25 cm<sup>2</sup> y 2 mL para botellas de 75 cm<sup>2</sup>) y se incubó en estufa a 37 °C, hasta observar el desprendimiento de la mayor parte de la monocapa (5 min aproximadamente). Las células se resuspendieron agregando el volumen de DMEM correspondiente (5 mL para botellas de 25 cm<sup>2</sup> o 10 mL para botellas de 75 cm<sup>2</sup>) y se transfirió todo el contenido a un tubo cónico estéril. Se centrifugó (5 min, 1300 x g, temperatura ambiente) y se descartó el sobrenadante; se resuspendieron las células en 5 o 10 mL de DMEM según correspondía, y se tomó una alícuota para realizar el recuento celular.

*Recuento celular:* Para realizar el recuento se mezclaron 50 µL de la suspensión celular con 50 µL de azul tripán y se colocó una gota de esta mezcla en una cámara de Neubauer. Se realizó el conteo en un microscopio invertido; donde se procedió a contar en diagonal dos cuadrantes opuestos (cada cuadrante tiene 16 cuadrados). El colorante azul tripán tiñe las células que no están viables, por lo cual sólo se contaron aquellas no coloreadas. Una vez obtenido el número de células totales por mL se realizó la dilución correspondiente de acuerdo a la concentración de células deseada y se procedió a realizar la siembra en placa para los ensayos.

### **3.3. Citotoxicidad de la muestras**

Se evaluó el efecto citotóxico de las distintas muestras a través de distintos métodos.

#### **3.3.1. Viabilidad celular por el método del rojo neutro**

El ensayo de citotoxicidad por absorción del colorante rojo neutro (RN) se basa en la habilidad de las células viables de incorporar y unir este colorante. El mismo es un colorante catiónico débil que penetra en las membranas por difusión pasiva y se concentra en los lisosomas, uniéndose por enlaces hidrofóbicos y electrostáticos a la matriz lisosomal (Winckler, 1974). Cuando la célula muere, el colorante no puede ser retenido y es liberado al medio extracelular. En consecuencia, la cantidad de colorante retenido es proporcional al número de células viables. Además, la captación de rojo neutro por las células viables se modifica por alteración en la superficie celular o en las membranas lisosomales. La integridad lisosomal, con la concomitante unión del colorante rojo neutro, es un indicador muy sensible de la viabilidad celular (Filman y col., 1975). Se sembraron células Caco-2 TC7 en placas de 96 pocillos en una concentración de  $2,5 \times 10^4$  células/pocillo y se incubaron en estufa hasta confluencia. Luego se retiró el medio, se lavó 2 veces con PBS estéril y se agregaron 200 µL de la muestra solubilizada en buffer fosfato 35 mM (pH = 7,8). La placa se incubó a 37 °C durante 3 h y luego de retirar la muestra y lavar con PBS se agregó 200 µL de medio que contenía 100 µg/mL de rojo neutro; para la preparación de este medio se usó DMEN Adhesión sin color, sin SFB, antibióticos ni aminoácidos (EMEVE Medios). Se incubó 3 h a 37 °C,

se retiró el colorante y se lavó 2 veces con PBS. Finalmente se agregó 100 µL de solución de fijación y extracción (50% etanol y 1% ácido acético) y se agitó 10 min. Se transfirió el sobrenadante a otra placa y se leyó la absorbancia a 540 nm. Se determinó la viabilidad celular según la *Ecuación 3.1*:

$$\% \text{ viabilidad} = (A_m/A_C) \times 100 \quad \text{Ecuación 3.1}$$

$A_m$ : absorbancia en presencia de la muestra.

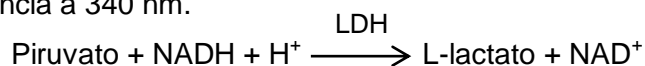
$A_C$ : absorbancia del Control (-) de muerte celular

Control (-) de muerte celular: Buffer fosfato 35 mM, pH = 7,8

Control (+) de muerte celular: Etanol 25 % p/v

### 3.3.2. Viabilidad celular por determinación de la enzima lactato deshidrogenasa

En el estudio de la citotoxicidad celular, la liberación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) al medio extracelular es un indicativo del daño en la integridad celular por un agente tóxico. De esta manera la determinación de su actividad en el sobrenadante celular es indicativa de la proporción de células muertas. Esta enzima cataliza la conversión de piruvato a lactato, utilizando NADH como cofactor durante la glicolisis y también cataliza las reacciones inversas durante el ciclo de Cori (Decker, 1988; Kaja y col., 2016). La oxidación del NADH por parte de esta enzima implica una caída en la absorbancia a 340 nm.



Se utilizó la línea celular Caco-2 TC7 sembrada en placas de cultivo de 96 fosas ( $2,5 \times 10^4$  células/pocillo). Luego de 24 h, se retiró el medio de cada pocillo, se agregaron 100 µL muestra y se incubó en estufa por 3 h. Luego se trasvasó el sobrenadante a otra placa y se cuantificó la actividad de LDH mediante el kit comercial LDH-P UV unitest (Wiener Lab, Argentina). Las muestras se hicieron reaccionar con el sustrato reconstituido conteniendo piruvato y NADH siguiendo las especificaciones del fabricante. Se realizó la lectura de la caída de la absorbancia a  $\lambda = 340$  nm en un lector de placas (SYNERGY HT-SIAFRT, Biotek Instruments, EE. UU) utilizando una placa de 96 pocillos apta para la lectura en el UV (Costar®). La actividad enzimática (UI) se expresó como la variación de absorbancia/min ( $\Delta A/\text{min}$ ). Se calculó como el promedio de la diferencia en las absorbancias/ minuto, a los tiempos 0,5, 1,5, 2,5 y 3,5 min. Luego se multiplicó por un factor de corrección dependiente de la temperatura de trabajo según las especificaciones del fabricante. Cada determinación se realizó por triplicado. La citotoxicidad se cuantificó en términos del porcentaje de liberación de LDH (*Ecuación 3.3*):

$$\% \text{ LDH} = (\text{LDH}_{\text{muestra}}/\text{LDH}_{\text{total}}) \times 100 \quad \text{Ecuación 3.2.}$$

$\text{LDH (U/I)} = \Delta A/\text{min} \times f \quad f (25^\circ\text{C}, 340 \text{ nm}) = 4,921$

$\text{LDH}_{\text{muestra}}$ : LDH (U/I) obtenido por tratamiento con las muestras.

$\text{LDH}_{\text{total}}$ : LDH (U/I) del Control (+) de muerte celular.

Control (+) de muerte: DMEM con Tritón X-100 3% (v/v). Provoca lisis celular.

### 3.3.3. Viabilidad celular por citometría de flujo

La citometría de flujo (CDF) es una técnica que permite medir las características físicas y químicas de las células u otras partículas biológicas. Los datos obtenidos se pueden usar para comprender y monitorear procesos biológicos y desarrollar nuevos métodos y estrategias para la detección y cuantificación celular. En comparación con otras herramientas analíticas, donde se obtiene un valor único para cada parámetro para toda la población, la CDF proporciona datos para cada partícula detectada. Como las células difieren en sus estados metabólicos o fisiológicos, esta técnica nos permite no solo detectar un tipo de célula particular sino también encontrar diferentes subpoblaciones de acuerdo con sus parámetros estructurales o fisiológicos (Comas-Riu y Rius, 2009). La CDF permite medir simultáneamente múltiples características ópticas (dispersión de luz y fluorescencia) de cada una de las células o partículas presentes en una suspensión. En un citómetro, las células individuales pasan a través de un haz de luz en una corriente de fluido dirigida. A medida que la luz procedente de la fuente de excitación golpea a las partículas en movimiento ocurren fenómenos de dispersión de luz y emisión de fluorescencia que se miden para cada partícula. La diferencia en la magnitud de la señal de dispersión y emisión generada por las células refleja diferencias biológicas entre ellas. Las señales generadas, fluorescentes y no fluorescentes se recolectan y se miden mediante el acoplamiento óptico de la señal a un sistema de detección que consta de filtros, cada uno de los cuales está vinculado a un fotodetector. La información generada con esta técnica puede agruparse en dos tipos fundamentales: 1) la generada por la dispersión de luz: la luz de dispersión hacia adelante en un ángulo pequeño (FSC, Forward Scatter) proporciona información sobre el tamaño de la célula, y la luz dispersada en un ángulo recto (SSC, Side Scatter) proporciona información sobre la granularidad y la morfología celular; 2) la generada por la emisión de luz: ocurre por fluorocromos generalmente añadidos a la célula, cuando son excitados por la fuente luminosa. La fluorescencia producida por estos fluorocromos se detecta mediante tubos fotomultiplicadores.

La citometría de flujo es particularmente importante para investigaciones biológicas, ya que permite el examen cualitativo y cuantitativo de células completas y constituyentes celulares previamente marcados con una amplia gama de reactivos comercialmente disponibles, tales como colorantes y anticuerpos monoclonales, en los instrumentos de clasificación celular activados por fluorescencia (FACS) (Jaroszeski y Radcliff, 1999).

*Integridad de la membrana:* La viabilidad celular se puede monitorear mediante CDF utilizando la capacidad de la célula para mantener una barrera efectiva frente al medio externo. Las células con una membrana dañada no pueden sostener ningún gradiente electroquímico y normalmente se clasifican como células muertas. La integridad de la membrana se puede detectar mediante la exclusión o la retención de un marcador. Los más usados son los marcadores de exclusión como el yoduro de propidio o el bromuro de etidio que tiñen los ácidos nucleicos en células con membranas permeabilizadas consideradas muertas (Comas-Riu y Rius, 2009). El yoduro de propidio (IP) es un agente que tiene la propiedad de intercalarse entre los pares de bases del ADN y emitir fluorescencia a una longitud de onda característica (617 nm). Es por esto que este

colorante es ampliamente utilizado para teñir las células y realizar estudios sobre el ADN de las mismas para conocer cómo se altera la distribución de las fases del ciclo celular. Las células muertas pierden la propiedad de permeabilidad selectiva entre el contenido intracelular y el medio extracelular y por lo tanto, incorporan colorante, el cual se intercala entre las bases del ADN en una relación de una molécula por cada 4-5 pares de bases. Una vez unido a los ácidos nucleicos, la fluorescencia de IP se ve incrementada unas 20-30 veces (Riccardi y Nicoletti, 2006).

*Potencial de membrana:* Las sondas fluorescentes usadas para determinar el potencial de membrana son compuestos lipofílicos cargados que pueden atravesar fácilmente las membranas celulares y acumularse en el interior celular. Los fluorocromos como la rodamina 123 y los oxonoles se han usado ampliamente ya sea solo o combinados con marcadores de integridad de membrana como el IP para la determinación del potencial de membrana y en ensayos de viabilidad celular. Dado que la rodamina 123 (Rh123) es una sonda fluorescente catiónica, el potencial eléctrico negativo que existe a través de la membrana mitocondrial permite el transporte de la sonda hacia su interior (Johnson y col., 1980) y por lo tanto esta sonda es indicativa de una correcta función mitocondrial en las células.

Para evaluar la citotoxicidad de las muestras proteicas de amaranto, se determinó la viabilidad celular en base a la integridad de la membrana plasmática por marcación con ioduro de propidio (IP) y citometría de flujo, a partir del siguiente procedimiento:

1. Obtención de monocapas de células Caco-2 TC7: Se sembraron 0,25 mL de una suspensión celular en placas de 24 pocillos (concentración final =  $6,2 \times 10^4$  células/pocillo) y se incubó durante 72 h en estufa; posteriormente se retiró el medio y se lavó con PBS.
2. Tratamiento con muestras: El medio de cultivo se reemplazó con 0,25 mL de las muestras a estudiar solubilizadas en buffer fosfato 35 mM (pH 7,8) y se incubó en estufa durante 3 h (37 °C, 5 %CO<sub>2</sub>). Se retiró la solución y se lavó con PBS. Las células fueron tripsinadas para su desprendimiento y la suspensión celular fue transferida a tubos de citómetro.

Además de los tubos con muestras se prepararon los siguientes sistemas control:

- Control (-): se agregó buffer en lugar de muestra.
  - Controles para la diferenciación entre células vivas y muertas: se prepararon tubos con mezclas de células vivas y células muertas, a algunos se agregó IP (control v/m con marca) y a otros no (control v/m sin marca). Las células muertas se obtuvieron por calentamiento a 55 °C durante 20 min.
3. Evaluación de la permeabilidad de la membrana: A cada tubo se le agregó IP en una concentración final de 1 µg/mL. Se incubó durante 10 min y se realizaron las determinaciones de CDF. Se utilizó un Citómetro de Flujo Becton Dickinson FACScalibur (Plataforma de Citometría de Flujo de la Facultad de Ciencias Exactas, UNLP). Para la evaluación de los resultados se utilizó el programa FlowJo X 10.0.7; luego de seleccionar la población a estudiar en un gráfico SSC-H vs. FSC-H, se analizó la intensidad de fluorescencia en el canal FL3 (correspondiente a IP) para analizar el porcentaje de células vivas y muertas.

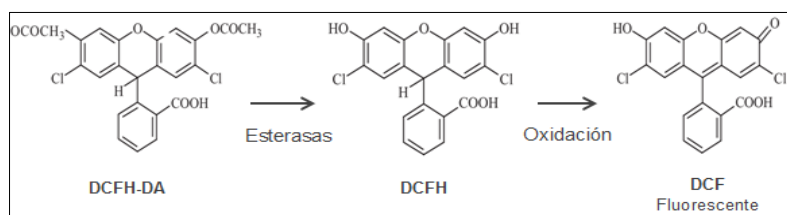
### 3.4. Inducción de la oxidación celular

Dado que nuestro objetivo era evaluar la capacidad de los péptidos de amaranto de interaccionar o ingresar a las células y ejercer un efecto antioxidante, en todos los ensayos realizados los cultivos se preincubaron con las muestras y luego se sometieron al proceso de inducción del estrés oxidativo previo retiro y lavado de la muestra en la solución extracelular. Según el biomarcador celular de estrés oxidativo a medir posteriormente, se utilizó  $\text{H}_2\text{O}_2$  o AAPH como factores estresantes, de acuerdo con ensayos previos de optimización. Como se mencionó anteriormente, en este tipo de estudios el estímulo estresante debe aplicarse al cultivo celular de manera tal que genere un estrés en la célula pero permitiendo que esta pueda generar una respuesta medible. En el caso de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , se evaluó el efecto citotóxico de distintas concentraciones (100-750  $\mu\text{M}$ ) mediante los ensayos de viabilidad celular a través de la determinación de la integridad de la membrana por citometría de flujo según el protocolo descrito en el inciso 3.3.3 y a través de la determinación de la actividad LDH (inciso 3.3.2). En cuanto al AAPH la concentración se seleccionó a partir de una gran variedad de datos existentes en bibliografía.

### 3.5. Evaluación de la inhibición de ROS intracelulares

Se evaluó la capacidad de las muestras para neutralizar ROS en células Caco-2 TC7 sometidas a daño oxidativo por  $\text{H}_2\text{O}_2$  mediante el uso de la sonda 2',7'-diclorohidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA). Esta sonda se aplica en estudios celulares debido a su capacidad de difundir a través de la membrana e ingresar a la célula, donde es hidrolizada a 2',7'-diclorohidrofluoresceína (DCFH) mediante esterasas intracelulares que rompen la unión con el acetato. La oxidación de DCFH por ROS origina la 2,7-diclorofluoresceína (DCF) que emite fluorescencia ( $\lambda_{\text{exc}} = 498 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 522 \text{ nm}$ ) (**Esquema 3.2**). Si bien durante mucho tiempo se consideraba que la ROS específica asociada a la oxidación de DCFH a DCF era el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , se ha demostrado que esta oxidación puede llevarse a cabo por otras ROS como  $\text{OH}^\bullet$  y  $\text{ROO}^\bullet$  y también por RNS como  $\text{NO}^\bullet$  y  $\text{ONOO}^-$ . Las peroxidasas celulares son fundamentales en la oxidación de DCFH a DCF por  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Gomes y col., 2005).

Este tipo de ensayos es lo que se denomina ensayo de actividad antioxidante celular (CAA) y tienen como objetivo evaluar la capacidad de los compuestos en estudio de reducir efectivamente el estado oxidativo intracelular. Es una herramienta importante para la evaluación del potencial del antioxidante para ejercer una respuesta a nivel celular (Wolf y Liu, 2007).



Esquema 3.2. Formación del compuesto fluorescente DCF a partir de la oxidación de DCFH-DA.

Luego de varios ensayos preliminares para optimizar este método, se arribó el siguiente protocolo final para evaluar la capacidad de las muestras para neutralizar ROS en cultivos Caco-2 TC7:

1. Obtención de monocapas de células Caco-2 TC7: Las células se sembraron en una placa oscura de 96 pocillos en una concentración de  $2,5 \times 10^4$  células/pocillo y se incubó 24 h en estufa (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). Se retiró el medio y se lavó con PBS.
2. Tratamiento con la sonda (T1): Se agregaron 100 µL de DCFH-DA 20 µM en PBS y se incubó 30 min en estufa (en oscuridad). Se retiró y se lavó con PBS.
3. Tratamiento con las muestras (T2): Se agregaron 100 µL de muestra y se incubó 1 h. Se retiró y se lavó con PBS.
4. Inducción del estrés oxidativo (T3): Se agregaron 100 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 500 µM en PBS y se incubó 1 h leyendo la fluorescencia ( $\lambda_{\text{exc}} = 485 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 528 \text{ nm}$ ) cada 10 min en un lector de placas (SYNERGY HT-SIAFRT, Biotek Instruments, EE. UU).

Se prepararon tres sistemas control:

- Control 1 (C1): Control de máximo estrés oxidativo. En T2 las células se incubaron con buffer fosfato pH 7,8 en lugar de muestra y luego se realizó la inducción del estrés oxidativo con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (T3).
- Control 2: Control de oxidación basal. Estas células no fueron tratadas con muestras ni sometidas a estrés oxidativo, tanto en T2 como en T3 se agregó buffer fosfato 35 mM, pH 7,8.
- Control 3: Control de fluorescencia intrínseca. En T1 y T2 se incubó con PBS y buffer muestra 35 mM pH 7,8 respectivamente y finalmente se incubó con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en T3.

El porcentaje de inhibición de ROS se calculó mediante la *Ecuación 3.3*:

$$\% \text{ inhibición ROS intracelulares} = (\Delta F_{C1} - \Delta F_M) \times 100 / \Delta F_{C1} \quad \text{Ecuación 3.3.}$$

$\Delta F_{C1}$ : diferencia de fluorescencia ( $F_{60\text{min}} - F_{0\text{min}}$ ) para C1

$\Delta F_M$ : diferencia de fluorescencia ( $F_{60\text{min}} - F_{0\text{min}}$ ) para M (muestra).

Los resultados se expresaron como porcentaje de C1, control de máxima oxidación.

### 3.6. Evaluación de la prevención de la oxidación de lípidos

Como se explicó anteriormente, la participación de ROS y RNS es crucial en el proceso de oxidación de lípidos celulares con los consecuentes efectos de estos procesos sobre la célula. La peroxidación lipídica genera productos complejos, incluidos peróxidos, hidroperóxidos, productos de escisión tales como aldehídos y materiales poliméricos. Dado que estos procesos pueden ejercer efectos dañinos a nivel celular, la detección de productos de peroxidación lipídica es fundamental en el estudio del daño oxidativo celular (Yoshida y col., 2013). Como ya se mencionó en el Capítulo 2, el método más utilizado en el análisis de la peroxidación lipídica en sistemas biológicos es el ensayo del ácido tiobarbitúrico (TBA) que se basa en la reacción de productos finales de la peroxidación lipídica con el TBA para producir un aducto de color rojo. Si bien originalmente se propuso que el malondialdehído (MDA) era la molécula que reaccionaba con el

TBA para dar el aducto coloreado (1:2), se sabe que otros productos de la oxidación lipídica, además del MDA, dan resultados positivos en el ensayo de TBA (Nair y Turner, 1984). Durante el ensayo, la muestra se calienta a bajo pH con ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) y el aducto coloreado resultante se mide por absorbancia ( $\lambda=532$  nm) o por fluorescencia ( $\lambda_{exc} = 532$ ,  $\lambda_{em} = 553$  nm). El producto coloreado se puede extraer con 1-butanol. Si bien parte del MDA detectado en esta prueba se forma durante el propio proceso de peroxidación, también se genera por descomposición de los peróxidos lipídicos durante la etapa de calentamiento en presencia de ácido, proceso que es acelerado por la presencia de iones de metales de transición. Por lo tanto, dado que el ensayo de TBA no mide solo el MDA formado en el sistema de peroxidación, el término sustancias reactivas al TBA (TBARS) es el que se usa generalmente para describir esta determinación (Gutteridge y Halliwell, 1990).

La capacidad de protección de las muestras frente a la oxidación de lípidos en cultivos Caco-2 TC7 se evaluó mediante el ensayo de TBARS a partir del método de Buege y Aust (1975), con algunas modificaciones. Se realizaron varios ensayos preliminares a fin de optimizar las condiciones del método. A continuación se detalla el protocolo final utilizado:

1. Obtención de monocapas de Caco-2 TC7: Las células se sembraron en una placa de 24 pocillos en una concentración de  $1,25 \times 10^4$  células/pocillo y se incubaron durante 5 días en estufa (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>). Se retiró el medio y se lavó con PBS.
2. Tratamiento con la muestra (T1): A cada pocillo se agregaron 200  $\mu$ L de muestra en buffer fosfato pH 7,8 y se incubó 1h en estufa. Se retiró y se lavó con PBS.
3. Inducción del estrés oxidativo (T2): Se agregaron 200  $\mu$ L de una solución de AAPH (Sigma) 1 mM en DMEN con 15 % de SFB y se incubó 12 h. Se retiró y se lavó con PBS.
4. Lisis celular (T3): Se agregaron 200  $\mu$ L de buffer lisis (buffer Tris 20 mM con 0,1 % de TritónX100) y 10  $\mu$ L de una solución de butilhidroxitolueno (BHT) 5 % p/v preparado en DMSO y se incubó 2 h en agitación. Luego se centrifugó a 13000 x g, 10 min, y se descartó el precipitado.
5. Reacción con TBA (T4): Cada sobrenadante se transfirió a un tubo de microcentrífuga, se agregaron 200  $\mu$ L de reactivo de TBA (0,8 % de TBA, 15 % de TCA y 0,25 N de HCl) y se incubó en un baño de agua a 95 °C durante 1 h. Finalmente, se centrifugó la mezcla de reacción a 1000 x g durante 10 min, se transfirió el sobrenadante a una placa de 96 pocillos y se leyó al fluorescencia ( $\lambda_{exc} = 532$ ,  $\lambda_{em} = 553$  nm).

Se realizaron dos controles de oxidación:

- Control 1 (C1): Control de máximo estrés oxidativo. En el T1 las células se incubaron con buffer fosfato pH 7,8 en lugar de muestra y luego se realizó la inducción del estrés oxidativo con el AAPH como se hizo con las células tratadas con muestra (T2).
- Control 2 (C2): Control de oxidación basal. Estas células no fueron tratadas con muestras ni sometidas a estrés oxidativo; en T1 y T2 fueron incubadas con buffer fosfato 35 mM, pH 7,8 y DMEM respectivamente.



Los resultados se expresaron como porcentaje de TBARS con respecto a C1.

### **3.7. Efecto sobre la actividad de enzimas antioxidantes y contenido de GSH.**

SOD, CAT y GPx son las principales enzimas antioxidantes que minimizan la cascada de ROS y eliminan los peróxidos citotóxicos en las células. Los cambios en las actividades de las enzimas antioxidantes celulares así como el contenido de GSH y su relación con el contenido GSSG se pueden considerar como biomarcadores de la respuesta antioxidante.

Se determinó el efecto de las muestras sobre el contenido de GSH y sobre la actividad enzimática de SOD y GPx frente a la inducción del estrés oxidativo. Para ello, se llevó a cabo el siguiente protocolo:

1. Obtención de monocapas de Caco-2 TC7: Las células se sembraron en una placa de 48 pocillos en una concentración de  $6,25 \times 10^4$  células/pocillo y se incubaron durante 6 días en estufa ( $37^\circ\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$ ). Se retiró el medio y se lavó con PBS.
2. Tratamiento con la muestra (T1): Se agregaron 200  $\mu\text{L}$  de muestra en buffer fosfato pH = 7,8 y se incubó 1 h en estufa. Se retiró y se lavó con PBS.
3. Inducción del estrés oxidativo (T2): Se agregaron 200  $\mu\text{L}$  de una solución de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Rieder-del-Haën) 500  $\mu\text{M}$  en PBS y se incubó 1 h. Se retiró y se lavó con PBS.
4. Lisis celular (T3): Las células de cada pocillo se levantaron incubando con tripLE durante 5 min en estufa. Se agregaron 200  $\mu\text{L}$  de PBS, se transfirió a un tubo de microcentrífuga y se centrifugó a  $600 \times g$  durante 5 min. Se descartó el sobrenadante y se agregaron 75  $\mu\text{L}$  de buffer de Lisis 1X (provisto en kit comercial de determinación de GSH). Se mezcló y se incubó durante 15 min en baño de hielo, se centrifugó durante 10 min a  $16000 \times g$  y se reservó el sobrenadante almacenándolo a  $-80^\circ\text{C}$  para las determinaciones de la actividad de las enzimas y el contenido de GSH.

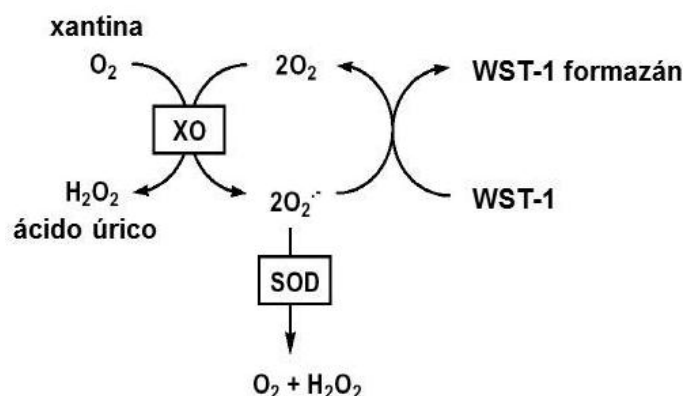
Al igual que en los ensayos anteriores, se realizaron los controles de oxidación correspondientes:

- Control 1 (C1): Control de máximo estrés oxidativo. En el T1 las células se incubaron con buffer fosfato pH 7,8 en lugar de muestra y luego se realizó la inducción del estrés oxidativo con el  $\text{H}_2\text{O}_2$  como se hizo con las células tratadas con muestra (T2).
- Control 2 (C2): Control de oxidación basal. Estas células no fueron tratadas con muestras ni sometidas a estrés oxidativo; en T1 y T2 fueron incubadas con buffer fosfato 35 mM, pH 7,8 y PBS respectivamente.

En todos los casos fue necesario optimizar las condiciones de reacción. A continuación se describen los protocolos finales para cada determinación.

### 3.7.1. Actividad de superóxido dismutasa

Como se explicó anteriormente, la SOD cataliza la dismutación del anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) en  $H_2O_2$  y  $O_2$ . El kit comercial utilizado (19160 SOD determination kit, Sigma-Aldrich) permite el análisis de actividad de la SOD mediante la sal monosódica de tetrazolio (WST-1, (2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolio, sal monosódica) capaz de producir formazán ( $\lambda_{max} = 450 \text{ nm}$ ) soluble en agua al reducirse por acción del  $O_2^{\cdot-}$ . Los iones  $O_2^{\cdot-}$  se generan a partir de la conversión de xantina y  $O_2$  en ácido úrico y  $H_2O_2$  por la xantina oxidasa (XO). La adición de SOD a esta reacción reduce los niveles de  $O_2^{\cdot-}$ , lo que reduce la velocidad de formación de formazán y produce una disminución de la absorbancia a 450 nm. La actividad de SOD en la muestra experimental se mide como el porcentaje de inhibición de la velocidad de formación de formazán (**Esquema 3.3**) (Peskin y Winterbourn, 2000).



Esquema 3.3. Reacciones involucradas en la determinación de SOD.

Para la determinación se mezclaron 20  $\mu\text{L}$  de sobrenadante con 200  $\mu\text{L}$  de solución de trabajo WST. Luego se agregaron 20  $\mu\text{L}$  de solución enzimática (XO), se mezcló y se incubó a 37 °C durante 60 min y se leyó la absorbancia a 450 nm en un lector de microplacas (BIOTEK INSTRUMENTS, SYNERGY-HT). El blanco de la reacción se realizó de igual manera pero los 20  $\mu\text{L}$  de muestra fueron remplazados por agua MilliQ. La actividad de SOD (% de inhibición de la formación de formazán) se calculó mediante la siguiente ecuación, tomando los valores de absorbancia a 45 min (*Ecuación 3.4*):

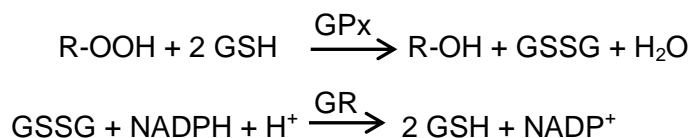
$$\text{Actividad SOD} = [(A_{\text{blanco}} - A_{\text{muestra}}) / (A_{\text{blanco}})] \times 100 \quad \text{Ecuación 3.4}$$

Los resultados se expresaron como porcentaje de C1, control de máxima oxidación.

### 3.7.2. Glutación Peroxidasa

Este conjunto de enzimas catalizan la reducción de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y una amplia variedad de peróxidos orgánicos ( $R\text{-OOH}$ ) a los correspondientes alcoholes estables ( $R\text{-OH}$ ) y agua usando glutatión celular como reactivo reductor. Se utilizó un kit comercial (Glutathione Peroxidase Cellular Activity Assay Kit, Sigma-Aldrich, CGP1) que emplea un método de determinación indirecta. Se basa en la reacción de oxidación de GSH a GSSG catalizada por GPx, que luego se acopla al reciclaje de GSSG de nuevo a GSH utilizando glutatión reductasa (GR) y

NADPH. La disminución en la absorbancia de NADPH medida a 340 nm durante la oxidación de NADPH a NADP<sup>+</sup> es indicativa de la actividad de GPx, ya que GPx es el factor limitante de la velocidad de las reacciones acopladas (**Esquema 3.4**).



*Esquema 3.4. Reacciones involucradas en la determinación de GPx.*

El kit provee como reactivo iniciador el t-Bu-OOH pero dado que este también es un sustrato para la glutatión S-transferasa para la determinación sobre los sobrenadantes celulares la reacción se inició agregando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en una concentración final de 0,2 mM y procediendo como indican las recomendaciones del kit: la catalasa debió bloquearse mediante la adición de NaN<sub>3</sub> en una concentración final de 1 mM y el pH del buffer de ensayo se ajustó a 7 dado que a un pH mayor habrá una reacción espontánea de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con GSH. El ensayo se realizó a 25 °C. Se mezclaron 10 µL de reactivo de ensayo NADPH con 10 µL de sobrenadante y 40 µL de NaN<sub>3</sub> 5 mM. La reacción se inició agregando 10 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 4 mM. Para llevar el volumen final de la reacción a 200 µL se utilizó el buffer de ensayo mantenido a 25 °C y a pH = 7. Se determinó la disminución de la absorbancia a 340 nm midiendo cada 10 seg durante 60 seg, posterior a un tiempo de reposo inicial de 15 seg (lector de microplacas BIOTEK INSTRUMENTS, SYNERGY-HT). Paralelamente a las muestras se realizó un blanco en el que la muestra se reemplazó por buffer de ensayo (máxima absorbancia). La actividad de la GPx en la muestra se determinó mediante la siguiente ecuación (*Ecuación 3.5*):

$$\text{Actividad (mmol/min/mL} = \text{U/mL)} = [(\Delta A/\text{min})_{\text{blanco}} - (\Delta A/\text{min})_{\text{muestra}}]/(6,22 \times V) \quad \text{Ecuación 3.5}$$

Donde:

$$(\Delta A/\text{min}) = \text{Diferencia de absorbancia por minuto} = (A_{65\text{seg}} - A_{5\text{seg}})/(60 \text{ seg})$$

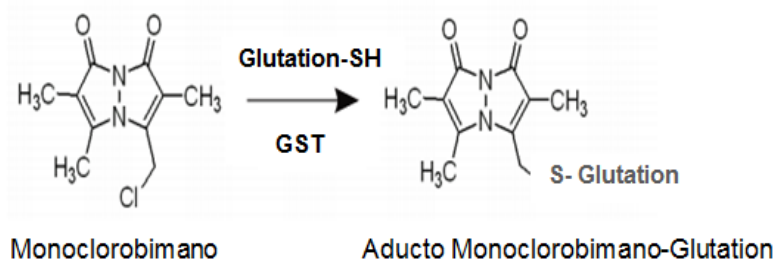
$$6,22 = \varepsilon \text{ (mM) del NADPH}$$

$$V = \text{Volumen de muestra (mL)}$$

Los resultados se expresaron como porcentaje de C1, control de máxima oxidación.

### **3.7.3. Contenido de glutatión reducido**

Para la determinación de GSH en los sobrenadantes se utilizó un kit comercial (Glutathione Assay Kit, Fluorimetric. Sigma, CS1020). Este kit se basa en la utilización de la sonda monoclorobimano, que puede pasar libremente a través de la membrana plasmática. La sonda libre muestra muy poca fluorescencia pero cuando se une al GSH (**Esquema 3.5**), en una reacción catalizada por la glutatión S-transferasa (GST), forma un aducto fuertemente fluorescente ( $\lambda_{\text{exc}} = 390 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 468 \text{ nm}$ ) (Fernández-Checa y Kaplowitz, 1990).



*Esquema 3.5. Reacciones involucradas en la determinación de GSH*

Para la determinación se mezclaron 6  $\mu\text{L}$  de sobrenadante con 5  $\mu\text{L}$  de solución de GST. La reacción se inició agregando 2,5  $\mu\text{L}$  de solución de sustrato, se incubó la placa a 37 °C durante 60 min y se leyó la fluorescencia ( $\lambda_{\text{exc}} = 360 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$ ). Paralelamente, se realizó una curva de calibración con cantidades de GSH de 0 a 8 nmoles. La cantidad de nmoles de GSH presentes en los sobrenadantes se determinó a partir de la regresión lineal de la curva de calibración. Los ensayos se realizaron por duplicado. Los resultados se expresaron como porcentaje de C1, control de máxima oxidación.

### 3.8. Evaluación de la prevención del daño en mitocondria y membrana celular por citometría de flujo.

Para evaluar un daño celular que puede ocasionar un efecto sobre la viabilidad se utilizan métodos de doble marcación tiñendo células muertas con un colorante y células vivas con otro colorante con una emisión diferente. La doble tinción con ioduro de propidio (IP) y rodamina 123 (Rh123) es una de las más usadas. En estos estudios la integridad de la membrana se evalúa mediante tinción con IP (marca células muertas), mientras que las células con mitocondrias funcionales que muestran un gradiente de potencial de membrana normal se identifican con Rh 123. En cuanto al comportamiento de las poblaciones celulares en este tipo de ensayos, Fraser y col., (2002) demostraron que cuando la proporción de células que exhibían fluorescencia con Rh123 disminuía, esta se acompañaba de un aumento de células marcadas con IP. En este tipo de ensayos se definen como población de células vivas aquella que presenta función mitocondrial óptima (positivo con Rh123) y membrana plasmática íntegra (negativa con IP); población de células muertas aquella que presenta ambos parámetros alterados (negativo con Rh123 y positivo con IP) y población vulnerable la que presenta solo 1 parámetro homeostático alterado (Lopez-Amoros y col., 1995; De Baulny y col., 1997). Con el fin de caracterizar la protección de las muestras a nivel mitocondrial y de la membrana plasmática frente a los daños producidos por  $\text{H}_2\text{O}_2$ , las células Caco-2 TC7 previamente tratadas con las muestras y sometidas al proceso de inducción del estrés oxidativo, fueron teñidas con las sondas fluorescentes Rh123 e IP y analizados por citometría de flujo, según el siguiente protocolo:

1. Obtención de monocapas de Caco-2 TC7: Se sembraron 0,5 mL de una suspensión celular en placas de 24 pocillos (concentración final =  $1,25 \times 10^5$  células/pocillo) y se incubó durante 48 h en estufa (37°C, 5 % CO<sub>2</sub>); posteriormente se retiró el medio y se lavó con PBS.
2. Tratamiento con las muestras (T1): En primer lugar se agregó a cada pocillo 200 µL de muestra (en buffer fosfato pH 7,8) y se incubó durante 1 h (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). Se retiró y se lavó con PBS
3. Inducción de estrés oxidativo (T2): se agregaron 200 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 500 µM en PBS y se incubó durante 1 h. Se retiró y se lavó con PBS.
4. Caracterización de la función mitocondrial y de la integridad de la membrana plasmática (T3): Las células de cada pocillo se levantaron incubando con triplex a 37 °C durante 5 min y se lavaron resuspendiendo en PBS y centrifugando a 700 x g durante 5 min. Para caracterizar la función mitocondrial se incubaron las células con solución de Rh123 en una concentración de 0,5 µg/mL a 37 °C por 15 min. Luego, para caracterizar la función de integridad de membrana plasmática, se incubó con solución de IP en una concentración final de 1 µg/mL durante 10 min. Las soluciones de las sondas se prepararon en PBS y el volumen final de cada tubo fue de 300 µL. Finalmente se realizó la medición en un Citómetro de Flujo Becton Dickinson FACScalibur (Plataforma de Citometría de flujo de la Facultad de Ciencias Exactas, UNLP). Para la evaluación de los resultados se utilizó el programa FlowJo X 10.0.7. Luego de seleccionar la población a estudiar en un gráfico SSC-H vs. FSC-H, se realizaron los gráficos de FL1 (canal verde para Rh123) vs FL3 (canal rojo para IP) para analizar el porcentaje de células vivas, muertas y dañadas. Se realizaron los siguientes sistemas control:
  - Control 1 (C1): Control de máxima estrés oxidativo. En el T1 las células se incubaron con buffer fosfato pH 7,8 en lugar de muestra y luego se realizó la inducción del estrés oxidativo con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como se hizo con las células tratadas con muestra (T2).
  - Control 2: Control de oxidación basal. Estas células no fueron tratadas con muestras ni sometidas a estrés oxidativo; tanto en T1 como en T2 fueron incubadas con buffer fosfato 7,8. Ambos controles fueron teñidos con las sondas según el punto 4.
  - Controles para la diferenciación entre células vivas y muertas: se prepararon tubos con mezclas de células vivas y células muertas, un tubo se marcó con IP y Rh123 (control v/m con doble marca), otro tubo se marcó solo con IP (control v/m con IP), un tercer tubo se marcó con Rh123 (control v/m con Rh) y un último tubo no se marcó con ninguna sonda (control v/m sin marca). Las células muertas se obtuvieron por calentamiento a 55 °C durante 20 min.

### 3.9. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el programa GraphPad Prism versión 5.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego California USA). Las datos fueron expresados respecto a C1 (control de máxima oxidación); se efectuó un análisis de varianza (ANAVA), y para la comparación de medias se utilizó el Test de Tukey con un nivel de significación de  $\alpha = 0,05$  (95% de confianza)

## RESULTADOS

El efecto de las muestras peptídicas sobre la oxidación intracelular en células Caco-2 TC7 se evaluó midiendo la variación de distintos biomarcadores luego del tratamiento con las muestras y en comparación con sistemas en ausencia de muestra. Se intentó seguir en todos los casos un esquema lo más similar posible, en el que inicialmente se incubó en presencia de la muestra para permitir que la misma interaccionara con o penetrara las células y posteriormente, y en ausencia de muestra libre extracelular, se agregó el inductor de oxidación. Sin embargo, de acuerdo a las características de cada tipo de evaluación, fue necesario modificar distintas condiciones tales como el tipo de placa (para lograr distintos números de células), el volumen de muestra, el agente inductor del estrés oxidativo ( $H_2O_2$  o AAPH). Finalmente se determinó el biomarcador específico en estudio. Para cada ensayo se realizaron controles de oxidación: Control 1 de máxima oxidación y Control 2 de oxidación basal.

En este Capítulo se presentarán en primer término los resultados obtenidos y posteriormente se realizará una discusión integral de los mismos, a fin de intentar comprender los procesos que están ocurriendo en su conjunto.

### 3.A. EFECTO DE *Ad* EN LA PREVENCIÓN DEL DAÑO OXIDATIVO INTRACELULAR

#### 3.A.1 Citotoxicidad de *Ad*

Se evaluó la citotoxicidad de las muestras proteicas de amaranto a fin de establecer un rango de concentraciones en las que estas no resultaran dañinas para las células. Esta información resulta fundamental antes de trabajar con los ensayos de actividad antioxidante intracelular así como antes de realizar los ensayos de absorción (Capítulo 4).

*Tabla 3.1. Citotoxicidad de distintas concentraciones de **Ad** determinada por los métodos de RN y LDH*

Conc. peptídica <b>Ad</b> (mg/mL)	% viabilidad método del RN	% actividad de LDH
5,8	81 ± 2	8 ± 2
2,9	98 ± 9	7 ± 1
1,16	91 ± 16	5 ± 1
0,58	115 ± 19	5 ± 2

*Los resultados se muestran como promedio de 2 determinaciones*

El rango de concentraciones de **Ad** evaluado fue de 0,58 mg/mL a 5,8 mg/mL. Como se puede observar en la **Tabla 3.1**, se obtuvieron porcentajes por encima de 80 % de viabilidad celular por el método del rojo neutro (RN), es decir, las concentraciones ensayadas de **Ad** mantuvieron en

todos los casos una alta funcionalidad lisosomal. Además de la determinación de la viabilidad celular por este método clásico de tinción, se midió la citotoxicidad de las muestras mediante el método de LDH con el fin de obtener más información. Como se puede observar en la **Tabla 3.1**, ninguna de las concentraciones evaluadas generó una liberación importante de LDH indicando que ninguna produjo daño en la integridad celular.

### 3.A.2. Efecto de *Ad* en el contenido de ROS intracelulares.

Existe evidencia de que las concentraciones de  $H_2O_2$  que provocan un daño celular importante son el orden de los mmol/L (mM). Wijeratne y Cuppett (2006) estudiaron el daño celular causado por la exposición de células Caco-2 a  $H_2O_2$  en distintas concentraciones y tiempos de incubación; la evaluación no mostró indicios de una pérdida de la viabilidad celular y tampoco de peroxidación lipídica en las células tratadas durante 30 min con concentraciones en el rango de 0 - 250  $\mu M$   $H_2O_2$ . Por otro lado, Martin y col. (1997) demostraron que células Caco-2 tratadas con concentraciones entre 250 y 800  $\mu M$  de  $H_2O_2$  durante 90 min mostraron un aumento de 3 veces en la peroxidación de lípidos en comparación con las células control, sugiriendo un estado de estrés oxidativo a estas concentraciones; particularmente, a la concentración de 500  $\mu M$  no se observó una alteración significativa en la integridad de la membrana celular. En cuanto a la utilización de mayores concentraciones de  $H_2O_2$ , Cilla y col. (2011) demostraron la existencia de una alta citotoxicidad oxidativa (65 %) inducida por incubación con  $H_2O_2$  a una concentración de 5 mM durante 2 h de células Caco-2. De manera similar, Wang y col. (2015) mostraron el efecto citotóxico (50 %) de  $H_2O_2$  1 mM durante 6 h en células Caco-2. Estos resultados indican que los efectos del  $H_2O_2$  en las células Caco-2 dependen de la concentración y del tiempo de exposición. Se analizó el efecto citotóxico de distintas concentraciones de  $H_2O_2$  (100 - 750  $\mu M$ ) evaluando la integridad de la membrana plasmática mediante marcación con IP y citometría de flujo. La metodología de selección de poblaciones de trabajo se explicará en la sección 3.A.5. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 3.2**.

*Tabla 3.2. Muerte celular de células Caco-2 TC7 en presencia de  $H_2O_2$  (IP y citometría de flujo).*

$H_2O_2$ ( $\mu M$ )	% Muerte celular
100	$14 \pm 3^a$
250	$19 \pm 4^{ab}$
500	$28 \pm 3^{bc}$
750	$36 \pm 2^c$

*Promedio  $\pm$  SD de al menos 2 determinaciones. Diferentes superíndices indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ )*

Estos resultados sugieren que el tratamiento con  $\text{H}_2\text{O}_2$  en las concentraciones evaluadas produce un cierto nivel de daño celular llevando a una disminución en la viabilidad celular. Como se observa el tratamiento con  $\text{H}_2\text{O}_2$  500  $\mu\text{M}$  produjo un 28 % de pérdida de viabilidad, sin diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) con concentraciones de 250 y 750  $\mu\text{M}$ . Dada la necesidad de utilizar una concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  que pueda generar un daño oxidativo en la célula sin provocar una alta tasa de muerte celular, se decidió utilizar para la inducción de la oxidación en los cultivos celulares una concentración de 500  $\mu\text{M}$ . El efecto de esta concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  sobre la viabilidad celular también fue evaluada mediante el método de LDH, obteniendo una actividad de la enzima de  $7 \pm 4$  %, registrándose un menor nivel de pérdida de integridad celular mediante esta metodología que por la citometría de flujo.

Existe en bibliografía una gran variedad de protocolos para la evaluación de ROS intracelulares mediante el ensayo con la sonda DCFH-DA. Entre las principales variables metodológicas podemos mencionar: el tipo y estadio (confluencia o no) celular, concentración (generalmente entre 10 y 25  $\mu\text{M}$ ) y tiempo de tratamiento con la sonda (generalmente entre 20 min y 1 h), agregado de muestra y sonda (en forma individual en distinto orden, o en simultáneo, tiempos en cada caso), lavados intermedios entre agregados, sustancia inductora del estrés oxidativo y su concentración (AAPH 1mM o  $\text{H}_2\text{O}_2$  generalmente entre 0,02 y 2 mM); y finalmente la forma de detección: lectura de fluorescencia en lector de placa o determinación por citometría de flujo (Wolfe y Liu, 2007; Hsu y col., 2010; Takahashi y col., 2014, Engelmann y col., 2005, Mendis y col., 2007, Samaranayaka, y col., 2010, B. Xu y Chang, 2010, Ryu, y col., 2011) En nuestro laboratorio se realizaron ensayos preliminares a fin de optimizar el ensayo de evaluación de ROS intracelulares en cultivos de células Caco-2 TC7, en los que se varió el tiempo de cultivo luego de la siembra en placa (24, 48 y 72 h), el tiempo de tratamiento con muestra (entre 1 y 24 h), la concentración y tiempo de la sonda, y se evaluaron ambos inductores del estrés oxidativo. En todos los casos se determinó la fluorescencia en función del tiempo en un lector de placas. Tanto el AAPH 1 mM como el  $\text{H}_2\text{O}_2$  500  $\mu\text{M}$  lograron inducir un aumento de ROS intracelulares.

A partir de los resultados obtenidos por marcación con IP y citometría de flujo junto con la determinación de la actividad de LDH y los datos de bibliografía se seleccionó la incubación con 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  durante 1 h como uno de los inductores del estrés oxidativo; tanto esta concentración como este tiempo se han utilizado ampliamente para generar estrés oxidativo en células Caco-2 (Wang y col., 2016 y Leong y col., 2017). En base a estos estudios preliminares se adoptó como protocolo final el descrito en la sección 3.6 de Materiales y Métodos, el cual permitió obtener diferencias detectables en el contenido de ROS intracelulares entre el control positivo o de máximo estrés oxidativo (ausencia de sustancia antioxidante, C1) y el control negativo (sin inducción de estrés oxidativo, C2). Un resumen de este protocolo puede observarse en la **Tabla 3.3**, donde se muestran los agregados realizados en los ensayos con las muestras así como en los controles C1, C2 y un control de fluorescencia intrínseca (no debida a la sonda, control 3).



Tabla 3.3. Tratamientos y controles en el ensayo de inhibición de ROS

Sistema	T1 (1h)	T2 (1h)	T3 (1h)
M	DCFH 20 $\mu$ M	Muestra	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 500 $\mu$ M
Control 1(C1)	DCFH 20 $\mu$ M	Buffer fosfato pH 7,8	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 500 $\mu$ M
Control 2 (C2)	DCFH 20 $\mu$ M	Buffer fosfato pH 7,8	PBS
Control 3 (C3)	PBS	Buffer fosfato pH 7,8	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 500 $\mu$ M

En la **Figura 3.1** se muestra la evolución de la formación de ROS (aumento de la fluorescencia) para los controles C1, C2 y C3 a lo largo de 3 h. Como se puede observar, C3 no presentó desarrollo de fluorescencia inespecífica de la reacción en estudio. C1 mostró un aumento de la fluorescencia a lo largo del tiempo mucho más importante que C2 indicando que el agregado de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 500  $\mu$ M generó un incremento en la formación de ROS. La velocidad del cambio en la fluorescencia fue disminuyendo en función del tiempo de incubación. El sistema C2 mostró una cierta evolución de la fluorescencia indicando la existencia de un nivel de ROS endógeno de las células. A partir de estos resultados, se decidió calcular el contenido de ROS intracelulares a partir de la variación de la fluorescencia luego de 60 min ( $\Delta F_{60\text{min}} - \Delta F_0$ ). De esta manera el aumento en el contenido de ROS intracelulares de C1 (inducción del estrés oxidativo por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 500  $\mu$ M) respecto a C2 (estado celular basal) fue de  $51 \pm 7$  %.

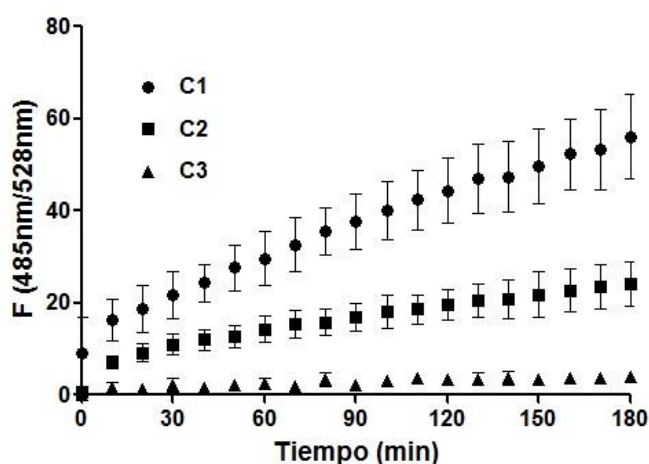


Figura 3.1. Evolución de la formación de ROS intracelulares (aumento de la fluorescencia) para los sistemas control (en ausencia de muestra): C1 (inducción de estrés oxidativo), C2 (control basal, sin inducción de estrés oxidativo) y C3 (control de fluorescencia intrínseca).

En la **Figura 3.2** se muestra la evolución de fluorescencia obtenida para C1, C2 y tres concentraciones de **Ad** en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 500  $\mu$ M.

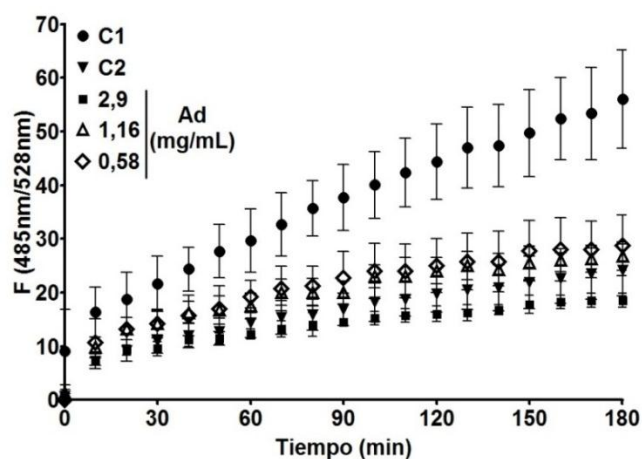


Figura 3.2. a) Curvas de fluorescencia en función del tiempo para C1, C2 y distintas concentraciones de **Ad** (2,9, 1,16 y 0,58 mg/mL). Los resultados se expresan como el promedio  $\pm$  SD de al menos 3 determinaciones.

Como se observa, la presencia de **Ad** tuvo un efecto en la inhibición de la formación de ROS en el rango de concentraciones evaluadas. En la **Figura 3.3** se observa el % de ROS a los 60 min con respecto a C1. Las tres concentraciones de **Ad** produjeron una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) en el contenido celular de ROS, alcanzando en el caso de las dos concentraciones más altas niveles similares al basal (C2). Por otro lado, se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre la mayor concentración evaluada (2,9 mg/mL) y la menor (0,58 mg/mL) sugiriendo que hay un efecto de la concentración.

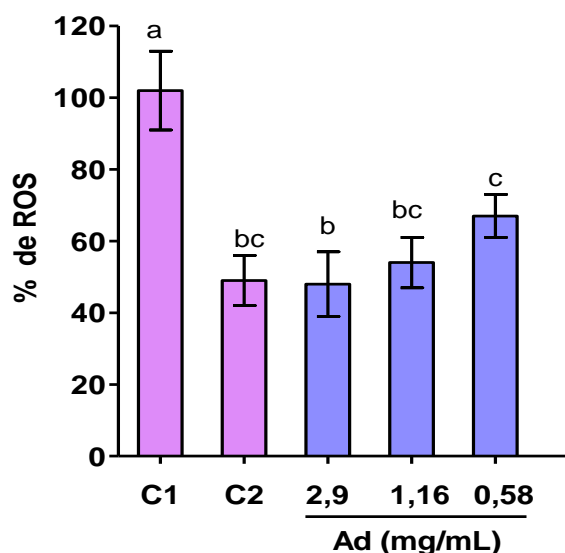


Figura 3.3. Contenido de ROS intracelulares (% respecto al control de máxima oxidación) en presencia de distintas concentraciones de **Ad**. Los resultados se expresan como el promedio  $\pm$  SD de al menos 3 determinaciones. Letras diferentes en la misma indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

### 3.A.3. Efecto de Ad en la prevención de la oxidación de lípidos.

Para evaluar el grado de oxidación lipídica celular se utilizó el ensayo de TBARS. Se realizaron varias pruebas preliminares con el objetivo de encontrar la óptima relación célula/reactivos y el mejor procedimiento de inducción. En todas estas pruebas, se mantuvo la misma relación de tiempo de contacto (1 h) entre la muestra y las células antes de la inducción de la oxidación, como se hizo en el ensayo de inhibición de ROS (sección 3.A.2.). Con el objetivo de encontrar un protocolo adecuado se llevaron a cabo los siguientes procedimientos evaluando los sistemas control: C1 (oxidación máxima) y C2 (oxidación basal):

#### Prueba A:

1. Obtención de monocapas de Caco-2 TC7: Las células se sembraron en una placa de 96 pocillos en una concentración de  $2,5 \times 10^4$  células/pocillo y se incubó durante 24 h en estufa ( $37^\circ\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$ ). Se retiró el medio y se lavó con PBS.
2. T1: 100  $\mu\text{L}$  de PBS e incubación de 1 h en estufa.
3. T2: 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  500  $\mu\text{M}$ , 1 h de incubación en estufa. Se retiró y se lavó con PBS.
4. T3: 100  $\mu\text{L}$  de buffer de lisis, 2 h de incubación en agitación. Se centrifugó a  $13000 \times g$ , 10 min y se descartó el precipitado.
5. T4: Al sobrenadante obtenido se le agregó 100  $\mu\text{L}$  de reactivo de TBA y se incubó a  $95^\circ\text{C}$  durante 1 h. Se centrifugó la mezcla de reacción a  $1000 \times g$  durante 10 min y se leyó la fluorescencia del sobrenadante ( $\lambda_{\text{exc}} = 532$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 553$  nm).

Esta prueba se llevó a cabo de igual manera que el ensayo de inhibición de ROS, en cuanto a relación célula/reactivos e inducción de la oxidación. Como se observa en la **Figura 3.4**, los valores de fluorescencia (es decir, el contenido de TBARS) obtenidos para ambos controles no presentaron diferencia, lo que indicó la necesidad de cambiar la manera de realizar el ensayo.

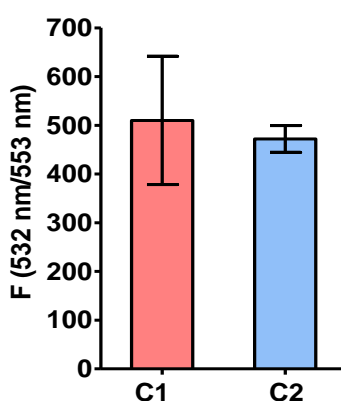
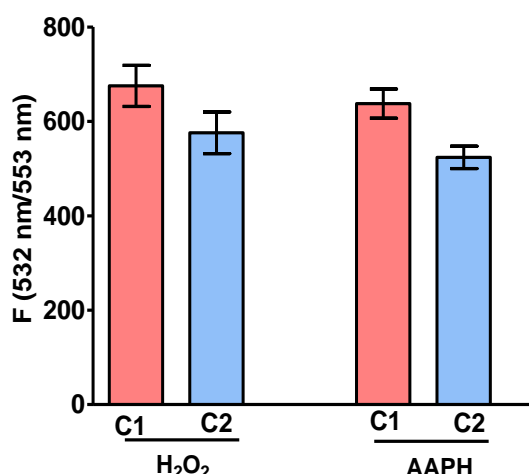


Figura 3.4. Determinación de TBARS en los controles de oxidación C1 y C2. Prueba A: Placas de 96 pocillos, oxidación con  $\text{H}_2\text{O}_2$  500  $\mu\text{M}$ , 1h.

#### Prueba B

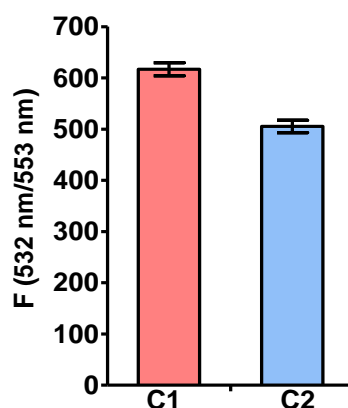
Con el objetivo de aumentar el nivel de oxidación lipídica y generar diferencias detectables por el ensayo de TBARS entre C1 y C2, se realizó el mismo procedimiento que en la prueba A pero en el T2 (inducción de la oxidación) se ensayaron dos estímulos diferentes,  $H_2O_2$  (500  $\mu M$ ) y AAPH (1 mM) aplicados durante 24 h. Como se observa en la **Figura 3.5**, si bien existen diferencias entre ambos controles para los dos factores de inducción, estas no fueron significativas ( $p > 0,05$ ). Por otro lado, mediante la observación microscópica de las células durante el ensayo pudo evidenciarse que aquellas monocapas tratadas con  $H_2O_2$  durante 24 h presentaban mayor pérdida de adherencia al plástico de la fosa luego de la incubación, lo cual genera pérdida de células en los pasos posteriores.



*Figura 3.5. Determinación de TBARS en los controles de oxidación C1 y C2. Prueba B: Placas de 96 pocillos, oxidación con  $H_2O_2$  500  $\mu M$  o AAPH 1 mM, aplicados durante 24 h.*

#### *Prueba C*

Dados los resultados anteriores, se decidió continuar los ensayos utilizando AAPH como inductor de la oxidación y, con el objetivo de aumentar el número de células se realizó la determinación utilizando monocapas de células crecidas en placa de 24 pocillos (siembra de  $1,25 \times 10^4$  células/pocillo e incubación 5 días en estufa). La inducción de la oxidación se realizó con AAPH durante 24 h. Los tratamientos fueron los mismos que en las pruebas anteriores pero se utilizó un volumen de muestra y reactivos de 200  $\mu L$ . Los resultados se muestran en la **Figura 3.6**.



*Figura 3.6. Determinación de TBARS en los controles de oxidación C1 y C2. Prueba C: Placas de 24 pocillos, oxidación con AAPH 1 mM aplicado durante 24 h.*

El control C1 (máxima oxidación) presentó un valor de fluorescencia (contenido de TBARS) alrededor de 20 % mayor que C2; además, esta prueba dio mejores resultados en cuanto a la dispersión entre replicados y adherencia celular a la placa en comparación a los otros.

Como se mencionó anteriormente, nuestro objetivo, a la hora de realizar la inducción del estrés oxidativo fue generar una respuesta a dicho estrés sin alterar de manera muy importante la viabilidad celular. Se encuentran en la bibliografía diversos trabajos en los que se utilizó AAPH como inductor del estrés oxidativo celular. Elisia y Kitts (2008) demostraron el efecto de antocianinas en la inhibición de ROS intracelulares inducidos mediante AAPH 1 mM, y, por otra parte, estudiaron el efecto de las antocianinas sobre la baja viabilidad celular, relacionada con la inducción de la apoptosis, generada por AAPH a una concentración de 15 mM. De forma similar, Xu y col., (2017) generaron un efecto importante en la viabilidad celular de células Caco-2, inducido por apoptosis, utilizando concentraciones altas de AAPH (10 mM, 24 h). Por otro lado, Yarnpakdee y col. (2015) encontraron que concentraciones de hasta 660  $\mu$ M de AAPH y 24 h mantuvieron buenos valores de viabilidad celular (80 %) en células HepG2. Todos estos datos indican que la utilización del AAPH como inductor del estrés oxidativo solo generará efectos negativos en la viabilidad celular a concentraciones altas y no producirá un daño grave a concentraciones de 1 mM o menos. En base a esto antecedentes y lo discutido en la sección 3.A.2, células Caco-2 tratadas con concentraciones de 500  $\mu$ M de  $H_2O_2$  durante tiempos entre 60-90 min o AAPH 1mM por 24 h sufren inducción de estrés oxidativo, sin muerte celular asociada. Sin embargo, al revisar detalladamente la bibliografía encontramos que si bien estas concentraciones de  $H_2O_2$  y AAPH generan un aumento de la oxidación de lípidos celulares este es moderado (Wijeratne y Cuppett, 2006). Inclusive, hay evidencia de que el aumento en la oxidación de lípidos en estas condiciones de inducción del estrés oxidativo es menor en células Caco-2 que en células HepG2, indicando, junto con otros parámetros, que la línea Caco-2 podría ser más resistente a la inducción de la oxidación (Martin y col. 1997). Por otro lado, el efecto sobre este biomarcador (oxidación de lípidos por el método de TBARS) en células Caco-2 se ha evaluado exitosamente para muchos antioxidantes a partir de procesos más potentes de inducción de la

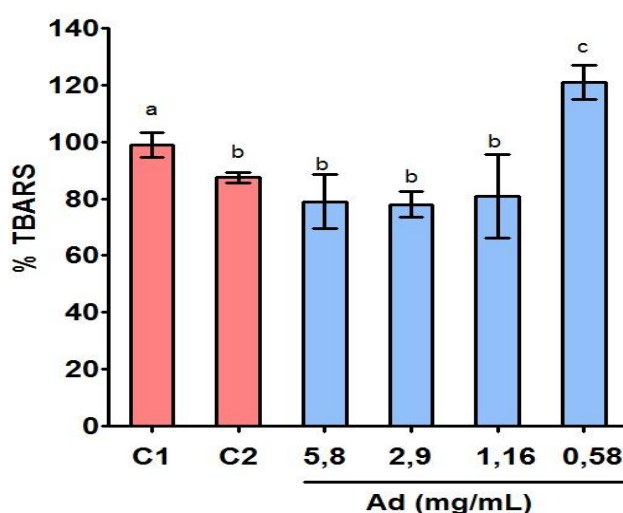
oxidación (mayor tiempo de incubación o mayor concentración de inductor), con el objetivo, incluso, de generar una alta tasa de muerte celular que pueda ser revertida por el antioxidante (Intra y Kuo, 2007, Song y Gao, 2014, Li, y col., 2018 y Querobino y col., 2018). Todos estos datos de bibliografía se corresponden con los resultados preliminares aquí obtenidos que indican una cierta dificultad para detectar inducción de estrés oxidativo en células Caco-2 TC7 a través de la oxidación de lípidos empleando el método de TBARS.

En función de estos antecedentes y de las pruebas preliminares realizadas, se seleccionó como inductor de estrés oxidativo para evaluar TBARS la incubación con AAPH 1 mM durante 24 h (protocolo C). Aunque las diferencias entre los controles C1 y C2 fueron pequeñas, se evaluó el efecto de las muestras peptídicas de amaranto sobre la oxidación lipídica celular. En la **Tabla 3.4** se muestran los sistemas analizados.

*Tabla 3.4. Tratamientos y controles en el ensayo de TBA*

Sistema	T1 (1 h)	T2 (24 h)	T3	T4
M	muestra	AAPH 1 mM	Lisis celular	TBA
C1	Buffer fosfato pH 7,8	AAPH 1 mM	Lisis celular	TBA
C2	Buffer fosfato pH 7,8	DMEM	Lisis celular	TBA

Los resultados obtenidos para los tratamientos con distintas concentraciones de **Ad** se muestran en la **Figura 3.7**, expresados como % respecto al control C1 (máxima oxidación). El contenido de TBARS de C1 fue significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) que el de C2 (éste presentó el 87 % de TBARS con respecto a C1).



*Figura 3.7. Fluorescencia debida a TBARS (% respecto al control de máxima oxidación C1) en presencia de distintas concentraciones de Ad. Los resultados se expresan como el promedio  $\pm$  SD de al menos 2 determinaciones. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).*

Por otro lado, las tres concentraciones más altas de **Ad**, 5,8, 2,9 y 1,16 mg/mL, presentaron un contenido de TBARS significativamente menor ( $p < 0,05$ ) que C1 (79, 78 y 81 %, respectivamente) y sin diferencias significativas respecto a C2, indicando que todas estas muestras lograron reducir la oxidación de lípidos cuando se realizó la inducción con AAPH y mantuvieron a la célula con el contenido de TBARS basal. Por último, en presencia de la concentración de **Ad** más baja (0,58 mg/mL) se registró un valor de TBARS mayor incluso que el de C1. Esta concentración de **Ad** había demostrado una cierta protección frente a la formación de ROS aunque menor que para las concentraciones mayores (sección 3.A.2); sin embargo, esto no explica los resultados de TBARS.

### 3.A.4. Efecto de Ad sobre la defensa antioxidante celular

Para evaluar el efecto de las distintas muestras de amaranto sobre la actividad de enzimas antioxidantes celulares así como sobre el contenido de GSH, se realizó el ensayo siguiendo el esquema general: en primer lugar se incubó con la muestra y luego se realizó la inducción de la oxidación ( $\text{H}_2\text{O}_2$  500  $\mu\text{M}$ ); en este caso, se realizó un último paso de lisis celular y obtención de los sobrenadantes sobre los que se realizaron los ensayos que se describen a continuación. A diferencia de las determinaciones anteriores (ROS y TBARS) el ensayo se realizó con monocapas crecidas en una placa de 48 pocillos. En la **Tabla 3.5** se muestran los sistemas analizados.

Tabla 3.5. Tratamientos y controles en el ensayo de efecto en la defensa antioxidante celular

Sistema	T1 (1h)	T2 (1 h)	T3	T4
M	Muestra	$\text{H}_2\text{O}_2$ 500 $\mu\text{M}$	Lisis celular	Enzima/GSH
C1	Buffer fosfato pH 7,8	$\text{H}_2\text{O}_2$ 500 $\mu\text{M}$	Lisis celular	Enzima/GSH
C2	Buffer fosfato pH 7,8	PBS	Lisis celular	Enzima/GSH

#### 3.A.4.1 Actividad de la SOD

En la **Figura 3.8** se presentan las curvas de determinación de la actividad SOD obtenidas durante un ensayo preliminar, para el blanco de reacción y los dos controles de oxidación (C1 y C2), donde se observa un máximo aumento de absorbancia (450 nm) en función del tiempo para el blanco (ausencia de SOD). Como se explicó anteriormente, el agregado de SOD proveniente de la muestra a la mezcla de reacción reduce los niveles de ión superóxido, lo que reduce la velocidad de formación de formazán produciendo un menor cambio de absorbancia a 450 nm. Si bien esta diferencia de absorbancia entre los controles y el blanco se puede ver en todos los tiempos analizados se consideró para el cálculo de la actividad las absorbancias a 45 min ya que a este tiempo se alcanza el máximo para el blanco. Por otro lado, no se observaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los dos controles de oxidación C1 y C2 ( $76 \pm 2$  % y  $75 \pm 3$  % respectivamente). Estos resultados indican que la inducción del estrés oxidativo en las células Caco-2 TC7 a través de  $\text{H}_2\text{O}_2$  500  $\mu\text{M}$  (1 h), si bien indujo un aumento en el contenido de ROS

intracelulares como se describió anteriormente (sección 3.A.2), no se reflejó en un cambio significativo en el nivel de actividad de la SOD.

En la **Figura 3.9** se muestran los resultados obtenidos para sistemas que fueron tratados con distintas concentraciones de **Ad** expresando la actividad como porcentaje respecto a C1. Además de no encontrarse diferencias significativas entre los controles de oxidación como se mencionó anteriormente, tampoco se registraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en presencia de las distintas concentraciones de **Ad** analizadas, lo cual resulta esperable ya el tratamiento de inducción oxidativa no logró modificar los valores de actividad de esta enzima.

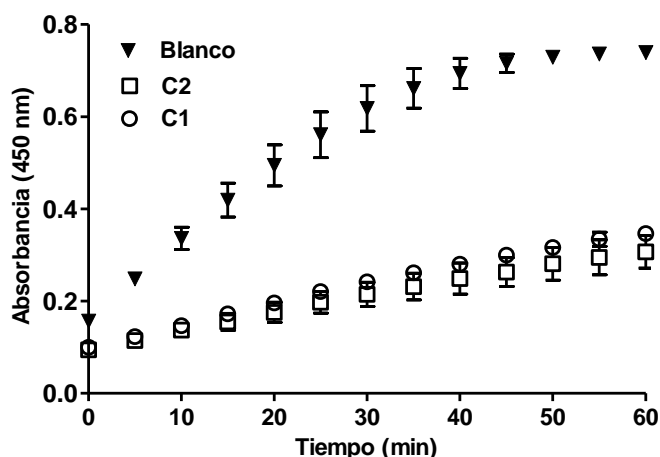


Figura 3.8. Determinación de actividad SOD: curvas de aumento de absorbancia a 450 nm en función del tiempo para el blanco de reacción y los dos controles: C1 (inducción de la oxidación) y C2 (basal).

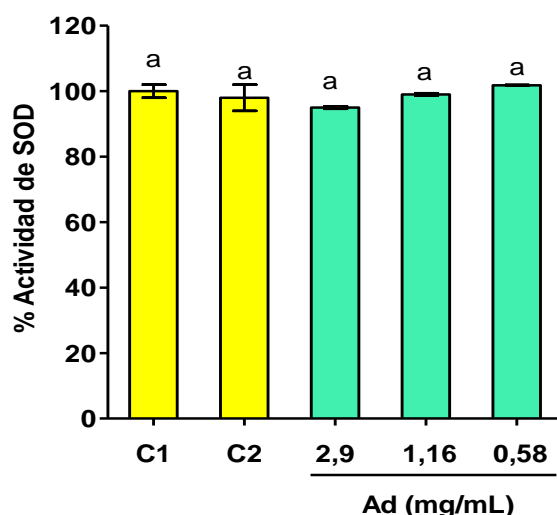
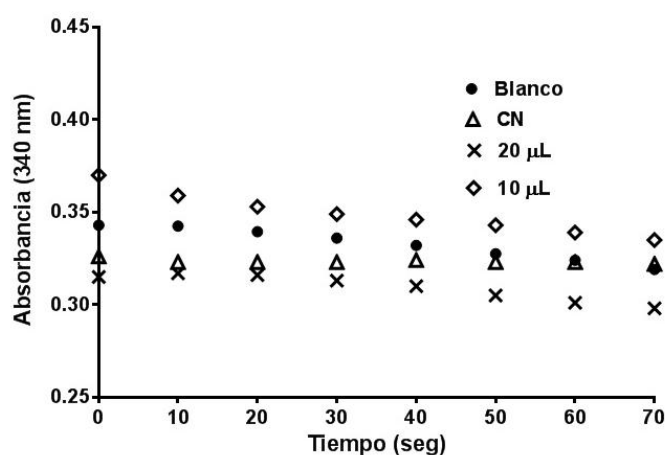


Figura 3.9. Actividad SOD intracelular para los sistemas control (C1 y C2) y para los sistemas con distintas concentraciones de **Ad**. Los datos se calcularon como porcentaje de C1. Los resultados se expresan como el promedio  $\pm$  SD de al menos 2 determinaciones. Letras diferentes en la misma indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).



### 3.A.4.2 Actividad de la GPx

Como se describió anteriormente, se utilizó un kit comercial que emplea un método de determinación indirecta. La disminución en la absorbancia de NADPH medida a 340 nm durante la oxidación de NADPH a  $\text{NADP}^+$  es indicativa de la actividad de GPx. Para la determinación de la actividad de la GPx se determinó la diferencia en la variación de absorbancia en el tiempo ( $\Delta A/\text{min}$ ) entre el blanco (ausencia de muestra, menor  $\Delta A/\text{min}$ ) y las muestras. Durante los ensayos preliminares se evaluó además del blanco, un control negativo (CN) sin el agregado de  $\text{H}_2\text{O}_2$  como inductor de la reacción de la GPx, con el objetivo de evaluar la presencia en las muestras de alguna actividad endógena de enzimas que usan NADPH y que pueden sesgar los resultados. Además, para optimizar el volumen de muestra a utilizar se probaron dos volúmenes distintos de uno de los sistemas con presencia de muestra (10 y 20  $\mu\text{L}$ ). En la **Figura 3.10** se muestran las curvas obtenidas.



*Figura 3.10. Determinación de la actividad GPx: curvas de absorbancia (340 nm) en función del tiempo para el blanco, el control negativo (CN) y dos volúmenes de muestra.*

Como se observa, el CN no sufrió variación de absorbancia a lo largo del tiempo indicando que en las muestras no hay actividad endógena de enzimas que consuman NADPH. Por otro lado, los dos volúmenes evaluados de muestra mostraron una caída de absorbancia apreciable y bastante similar. Por este motivo y para usar la menor cantidad de muestra posible, se decidió realizar el resto de los ensayos con 10  $\mu\text{L}$  de muestra. En estas condiciones, se registraron valores sin diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) para C1 y C2 (0,16 y 0,14 U/mL, respectivamente).

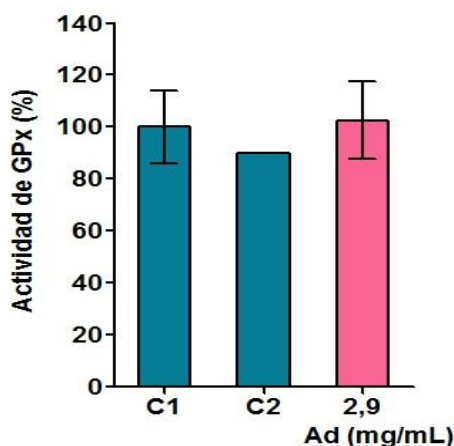


Figura 3.11. Actividad de GPx para los sistemas control (C1 y C2) y para el sistema con Ad (2,9 mg/mL). Los resultados se calcularon como porcentaje de C1. Los resultados se expresan como el promedio  $\pm$  SD de al menos 2 determinaciones.

Se realizó la determinación de sistemas tratados con distintas concentraciones de **Ad** (2,9, 1,16 y 0,58 mg/mL). En el caso de las sobrenadantes provenientes de las dos concentraciones más bajas de **Ad**, el  $\Delta A/\text{min}$  fue similar al registrado para el blanco, indicando que no fue posible detectar actividad enzimática en estas muestras, por lo tanto, aunque no fue posible obtener un valor numérico, se puede decir que se registró una disminución de esta actividad. Sin embargo, en el caso de tratamiento con **Ad** 2,9 mg/mL, el valor obtenido no presenta diferencia significativa ( $p > 0,05$ ) con los controles C1 y C2 (**Figura 3.11**). Estos resultados sugieren algún efecto de Ad dependiente de la concentración sobre esta actividad.

### 3.A.4.3 Contenido de GSH intracelular

Para la determinación se utilizó un kit comercial que se basa en la utilización de la sonda monoclorobimano, que puede pasar libremente a través de la membrana plasmática y unirse al GSH para formar un aducto fluorescente. La determinación se realizó mediante una curva de calibración donde se evaluó la fluorescencia para distintas cantidades de GSH patrón (**Figura 3.13**).

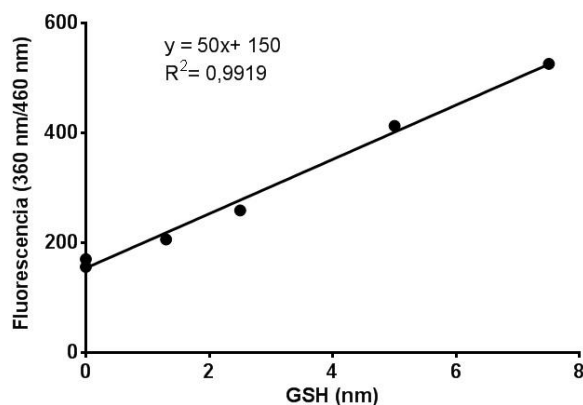
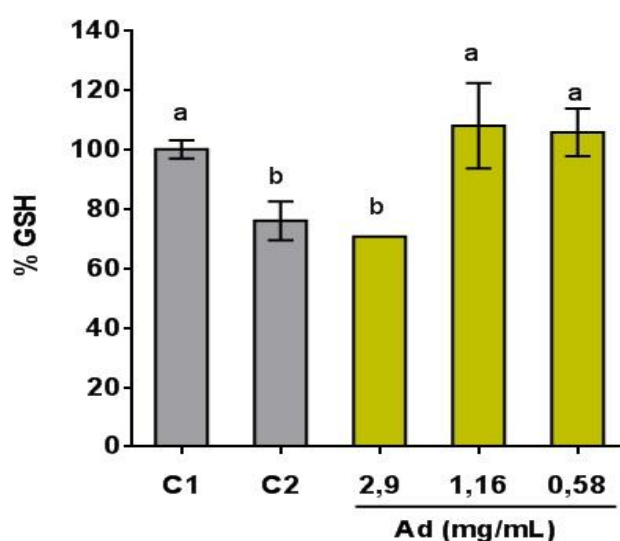


Figura 3.13. Curva de calibración obtenida para la determinación de GSH.

Los valores de GSH determinados a partir de la curva para los controles C1 y C2 fueron  $0,61 \pm 0,05$  y  $0,44 \pm 0,04$  nmoles; esto es, se registró un aumento pequeño aunque significativo ( $p > 0,05$ ) en el contenido de GSH luego del tratamiento con  $\text{H}_2\text{O}_2$  500  $\mu\text{M}$  (1 h). En la **Figura 3.14** se muestra el contenido de GSH presente en los lisados celulares (expresado como % respecto a C1) para cada sistema evaluado. Como puede observarse, el contenido de GSH en C2 fue significativamente menor (aproximadamente un 70 %,  $p < 0,05$ ) respecto a C1 como se mencionó previamente. Cuando las células fueron tratadas con una concentración de 2,9 mg/mL de **Ad**, el valor de GSH fue similar al de C2, mientras que para las concentraciones menores, los valores fueron similares a los de C1. Por lo tanto, **Ad** en concentración de 2,9 mg/mL fue capaz de restablecer el contenido de GSH a los valores basales.



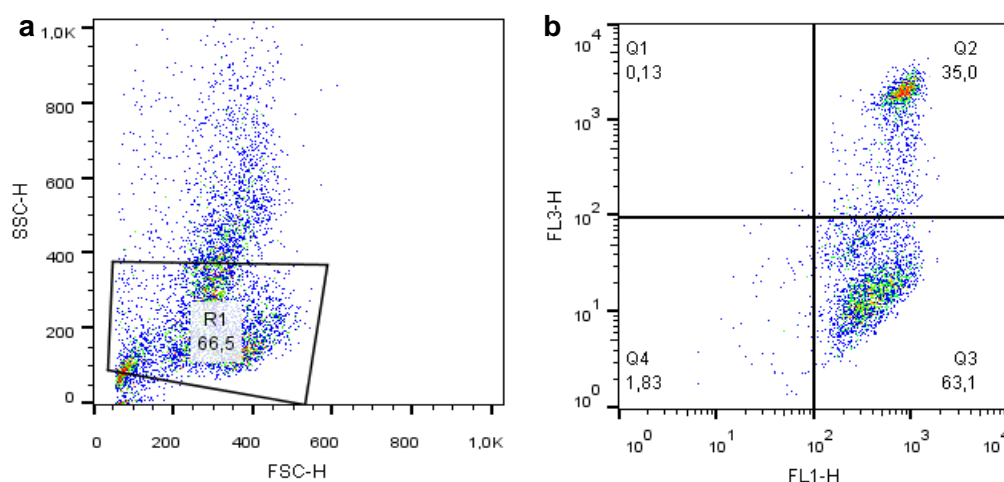
*Figura 3.14. Contenido de GSH para los sistemas control (C1 y C2) y para los sistemas con distintas concentraciones de Ad. Los resultados se calcularon como porcentaje de C1. Los resultados se expresan como el promedio  $\pm$  SD de al menos 2 determinaciones. Letras diferentes en la misma indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).*

#### **3.A.4.4 Daño en la membrana y mitocondria celulares.**

Como se describió en la sección 3.8 de Materiales y Métodos, en esta determinación se utilizó un sistema de doble marca. En primer lugar se agregó Rh123, cuya fluorescencia positiva es indicativa de mitocondrias celulares funcionales y luego IP cuya fluorescencia positiva indica pérdida de integridad en la membrana plasmática. El análisis se realizó por citometría de flujo. Para la determinación se evaluó la fluorescencia en ambos sistemas control (C1 y C2) y en los sistemas con presencia de **Ad**.

*Selección de poblaciones de trabajo:* a partir de los controles de marcación se seleccionó la población correspondiente a células Caco-2 TC7. En primer lugar se analizaron los gráficos SSC vs FSC (que evalúan tamaño y granulosidad) y se seleccionó la población de células (descartando las partículas muy pequeñas (trozos celulares) o muy grandes (agregados celulares)). Una vez

seleccionada esta población, se grafica la fluorescencia de FL-3 vs FL-1 para la misma. Este procedimiento se realizó para todos los controles de marcación, es decir: mezcla de células vivas y muertas (55 °C) sin marcar, con doble marca, marcadas con Rh 123 y marcadas con IP. Finalmente, analizando el comportamiento de estas poblaciones control se seleccionó la misma población celular (es decir los mismos valores de SSC y FSC) y los mismos valores de fluorescencia para definir los cuadrantes para todas las muestras analizadas posteriormente. En la **Figura 3.15** se muestra un ejemplo del procedimiento realizado, en este caso para el sistema control de vivas y muertas con doble marca.



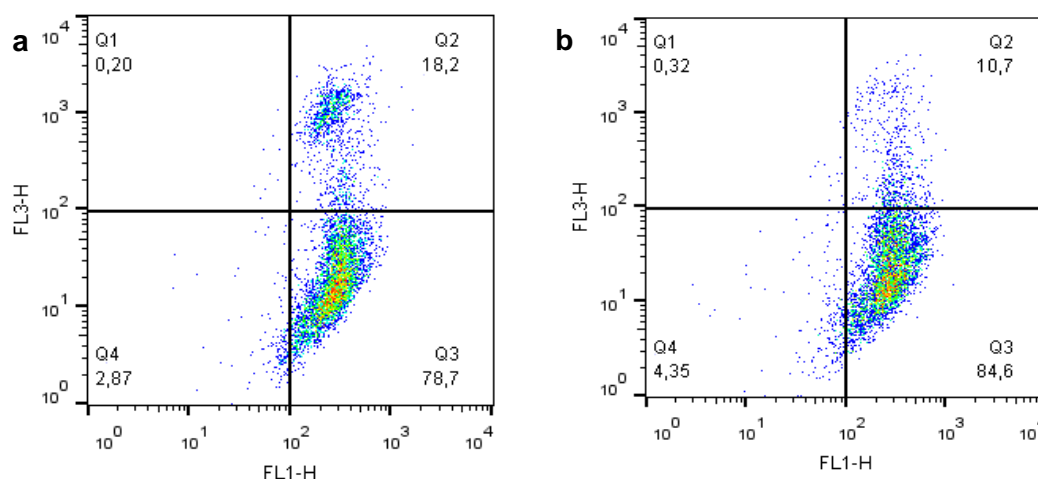
*Figura 3.15. Selección de poblaciones de trabajo a partir de los controles de marcación. Células vivas y muertas con doble marca a): selección de células a partir de los parámetros SSC-H y FSC-H; b) Gráficos de fluorescencia FL-3 (IP) vs FL-1 (Rh123) para la población de células seleccionada mostrando la definición de los cuadrantes.*

Para el análisis de los datos se seleccionaron cuatro poblaciones según la fluorescencia correspondiente a cada marcador; estas se denominaron: vivas, muertas, con daño a nivel mitocondrial (perdida de funcionalidad) y con daño en la membrana plasmática (pérdida de la integridad). En los gráficos de fluorescencia de FL-3 (IP) vs FL-1 (Rh 123) se seleccionaron los cuadrantes correspondientes a cada una de estas poblaciones (**Figura 3.15**). En la **Tabla 3.6** se muestra un resumen de las características de fluorescencia de estas poblaciones.

*Tabla 3.6. Características de fluorescencia de las posibles poblaciones celulares luego de la marcación con IP y Rh123.*

Poblaciones celulares	Rh123 (FL-1) (verde)	IP (FL-3) (rojo)	Cuadrante
Vivas	+	-	Q3
Muertas	-	+	Q1
Con daño mitocondrial	-	-	Q4
Con daño en membrana plasmática	+	+	Q2

En la **Figura 3.16** se muestran los gráficos de fluorescencia de FL-3 (IP) vs FL-1 (Rh123) y la selección de los cuadrantes para los controles C1 y C2.



*Figura 3.16. Gráficos de fluorescencia FL-3 (IP) vs FL-1 (Rh123) obtenidos por citometría de flujo para los controles de oxidación: a) C1 (máxima oxidación), b) C2 (oxidación basal).*

Como puede observarse, en ambos casos, la población principal se encuentra en el cuadrante Q3, correspondiente a células vivas (estas células poseen funcionalidad a nivel de su membrana plasmática y a nivel mitocondrial), y no se encontraron diferencias significativas para esta población entre ambos controles (**Tabla 3.7**). La segunda población importante se registró en el cuadrante Q2, correspondiente a aquellas células con tinción compatible con daño en la membrana plasmática pero aun así continúan mostrando funcionalidad (potencial de membrana) mitocondrial. Esta población doblemente marcada representaría células levemente dañadas o “moribundas” que han perdido su capacidad de excluir al IP; las mitocondrias de estas células pueden retener Rd123 dependiendo de su status funcional durante el proceso que llevaría a la muerte celular (Fraser y col., 2002). En este caso tampoco se observaron diferencias significativas entre los controles (**Tabla 3.7**). En cuanto a las otras dos poblaciones observadas (Q1 (muertas) y Q4 (con daño mitocondrial)), el porcentaje de células fue muy bajo y no se registraron diferencias

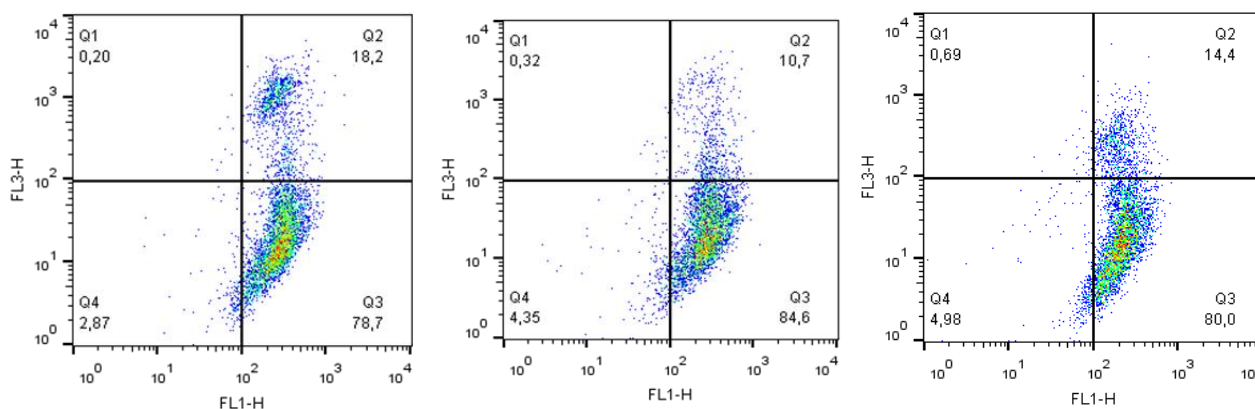
significativas entre C1 y C2 para ambos cuadrantes. Estos resultados indican que el tratamiento de inducción con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 500  $\mu$ M no generó muerte celular (como ya se había demostrado en la sección 3.A.2) ni tampoco daño registrable por esta metodología a nivel de la membrana plasmática o de la mitocondria.

*Tabla 3.7. Proporción de las distintas poblaciones celulares*

	C1	C2	Ad (1,16 mg/mL)
<b>Q1 (muertas)</b>	0,8 $\pm$ 0,8	1 $\pm$ 1	0,4 $\pm$ 0,5
<b>Q2 (daño en membrana plasmática)</b>	15 $\pm$ 3	12 $\pm$ 3	14,9 $\pm$ 0,6
<b>Q3 (Vivas)</b>	81 $\pm$ 4	81 $\pm$ 8	82 $\pm$ 3
<b>Q4 (daño mitocondrial)</b>	3 $\pm$ 2	6 $\pm$ 5	3 $\pm$ 3

*Se muestran los promedios  $\pm$  SD de al menos 2 determinaciones.*

Cuando las células fueron tratadas con **Ad** tampoco se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre las proporciones de las 4 poblaciones para ninguna de las concentraciones, en comparación con C1 y C2. En la **Tabla 3.7** se muestran los valores obtenidos para cada población analizada para el sistema tratado con **Ad** en una concentración de 1,16 mg/mL. En la **Figura 3.17** se muestra uno de los gráficos (uno de los replicados) de fluorescencia FL-3 (IP) vs FL-1 (Rh123) obtenidos por citometría de flujo para **Ad** 1,16 mg/mL a modo de ejemplo.



*Figura 3.17. Gráficos de fluorescencia FL-3 (IP) vs FL-1 (Rh123) obtenidos por citometría de flujo: a) C1, control de máxima oxidación y b) C2, control de oxidación basal y c) Ad 1,16 mg/mL*

En función de estos resultados podemos decir que la evaluación a partir de citometría de flujo y marcación con IP y Rh123 no reveló pérdida de la integridad de membrana plasmática ni daño a nivel de la membrana mitocondrial por efecto del tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 500  $\mu$ M (1 h). Tampoco se evidenció ninguna modificación cuando las células fueron preincubadas con el digerido gastrointestinal de aislado de amaranto.

### 3.B. EFECTO DE LAS FRACCIONES DE *Ad* SOBRE EL DAÑO OXIDATIVO INTRACELULAR

Se evaluó el efecto las fracciones de *Ad* obtenidas por cromatografía FPLC de filtración en gel (Capítulo 1, Figura 1.7). Si bien en algunas determinaciones fue posible evaluar el efecto de la mayoría de las fracciones; para otras se decidió trabajar solo con algunas representativas de cada pico del cromatograma.

#### 3.B.1. Citotoxicidad de las fracciones de *Ad*

En la **Tabla 3.8** se muestran los resultados para la citotoxicidad de las fracciones de 3-37 de *Ad* evaluada por el método por el método de LDH. Como se observa, ninguna de estas fracciones generó una liberación importante de LDH indicando que ninguna produjo pérdida de viabilidad celular. Las fracciones que presentaron un mayor porcentaje de actividad LDH (entre 17 y 20 %) fueron las fracciones 5 y 6 (masas moleculares cercanas a 10 kDa), 16 y 18 (masas cercanas a 3 kDa).

*Tabla 3.8. Viabilidad celular obtenida por determinación de la actividad de LDH para las fracciones F3 a F37 de Ad.*

Fracción	MM (kDa)	% LDH	Fracción	MM (KDa)	% LDH
F3	>10	8 ± 4	F21	1,4-1,6	13 ± 3
F4	>10	9 ± 2	F22	1,25-1,4	12 ± 2
F5	>10	20 ± 3	F23	1,1-1,25	14 ± 2
F6	9,5->10	18 ± 5	F24	0,97-1,1	16 ± 2
F7	8,4-9,5	12 ± 4	F25	0,86-0,97	14 ± 4
F8	7,4-8,4	12 ± 1	F26	0,75-0,86	4 ± 1
F9	6,5-7	12 ± 3	F27	0,66-0,75	7 ± 1
F10	5,7-6,5	9 ± 4	F28	0,59-0,66	0,06 ± 0,02
F11	5,1-5,7	11 ± 4	F29	0,52-0,59	5 ± 1
F12	4,4-5,1	4,8 ± 0,3	F30	0,45-0,52	8,1 ± 0,8
F13	3,9-4,4	8,6 ± 0,3	F31	0,40-0,45	6 ± 2
F14	3,5-3,9	7 ± 3	F32	0,35-0,40	4 ± 0
F15	3,0-3,5	14 ± 2	F33	0,31-0,35	9 ± 0
F16	2,7-3,0	18 ± 3	F34	0,27-0,31	9 ± 1
F17	2,4-2,7	10 ± 4	F35	0,24-0,27	9 ± 2
F18	2,1-2,4	17 ± 5	F36	0,21-0,24	8 ± 1
F19	1,8-2,1	5 ± 3	F37	0,19-0,21	12 ± 2
F20	1,6-1,8	12 ± 4			

#### 3.B.2. Evaluación del efecto de las fracciones de *Ad* en el contenido de ROS intracelulares

Como se explicó anteriormente, para esta determinación se realizó la inducción de la oxidación celular incubando las monocapas celulares con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 500 µM durante 1h (sección 3.5., Materiales y Métodos). En la **Figura 3.18** se muestran los valores de porcentajes de ROS (respecto al control de inducción de la oxidación C1) obtenidos para las fracciones 1 a 39 de *Ad*. Todas las fracciones evaluadas generaron una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) en el contenido intracelular de ROS

respecto a C1. Las fracciones que presentaron la mayor inhibición (menor contenido) de ROS (entre 39 y 66 % respecto a C1) fueron F1 a F6, F8 a F30, F33, F35, F37 y F39. Estas fracciones no presentaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) con C2 (51 %); indicando que mantuvieron a la célula en su estado basal de oxidación. Por otro lado, se registró otro grupo de fracciones menos activas (F7, F31, F32, F34, F36, F38) que presentaron mayores contenidos de ROS (entre 70 y 83 % respecto de C1). Estos valores fueron significativamente mayores ( $p < 0,05$ ) que el valor obtenido para C2, indicando que si bien disminuyeron la generación de ROS no lograron llevar a las células a su estado basal.

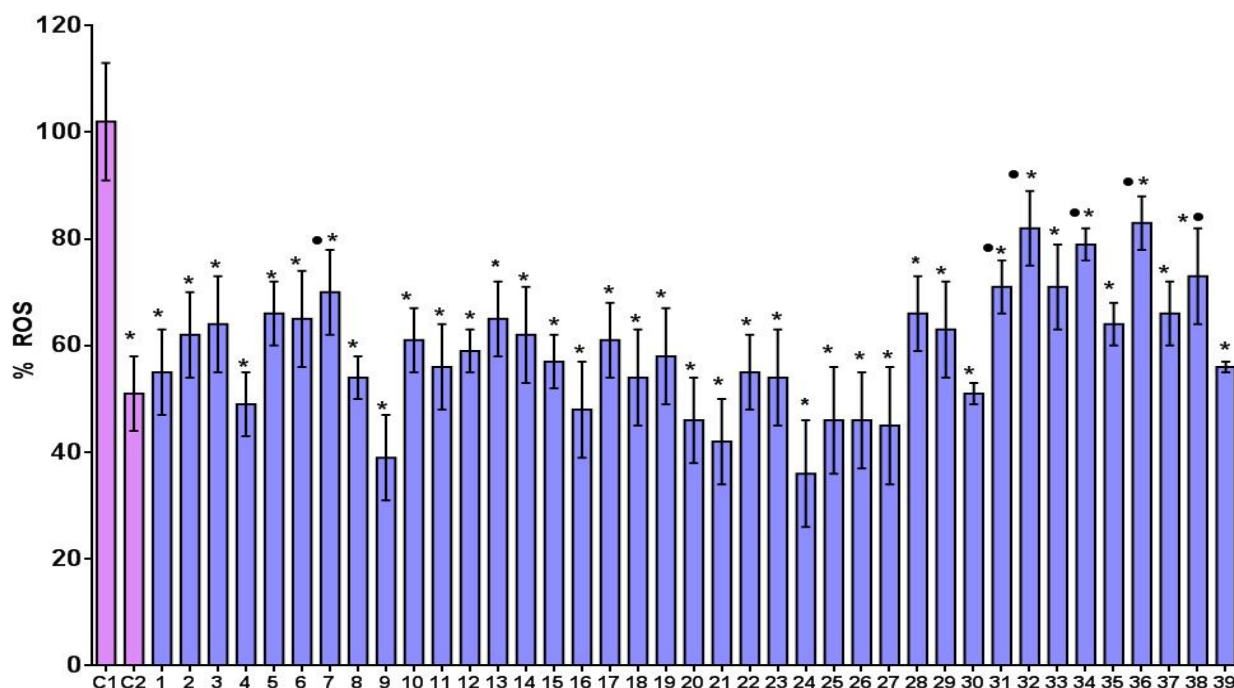


Figura 3.18. Contenido de ROS intracelulares (% respecto a C1) en presencia de fracciones FPLC separadas de Ad. Los resultados se expresan como el promedio  $\pm$  SD de al menos dos determinaciones. En este caso se presentan solo las diferencias de las fracciones con respecto a los controles de oxidación: \*indica diferencias significativas con C1, •indica diferencias significativas con C2 ( $p < 0,05$ ).

Wang y col. (2015) demostraron la actividad antioxidante de fracciones peptídicas obtenidas a partir de harina de maíz mediante la evaluación de la inhibición en la formación de ROS usando la sonda DFCH-DA en cultivos de células Caco-2. Se estudiaron dos fracciones, una con peso molecular inferior a 1 kDa y la segunda con peso molecular entre 1 y 3 kDa. La inducción de la oxidación se realizó con  $H_2O_2$  1 mM durante 6 h. Ninguna de las fracciones mostró una actividad significativa a concentraciones de 0,01 mg/mL mientras que si lo hicieron a mayores concentraciones (0,05 - 1 mg/mL). En nuestro caso, las concentraciones de las fracciones están en un rango comparable que va desde  $< 0,05$  a 0,32 mg/mL (Tabla 1.7) y también se encontró



actividad para un amplio rango de masas moleculares. Las moléculas menos activas correspondieron a masas moleculares pequeñas (< 0,4 kDa).

### 3.B.3. Evaluación del efecto de las fracciones de Ad en la oxidación lipídica

El efecto de las fracciones sobre la generación de TBARS se determinó de igual manera que en el caso de **Ad**, realizando la inducción de la oxidación con AAPH 1mM durante 24 h (sección 3.A.3) Para la determinación se seleccionaron algunas fracciones representativas de los distintos picos del cromatograma de FPLC (Capítulo 1, Figura 1.7 y Tabla 1.7): F8 (7,4-8,4 kDa) y fracciones 17-34 (2,7-0,27 kDa). En la **Figura 3.19** se muestran los resultados obtenidos.

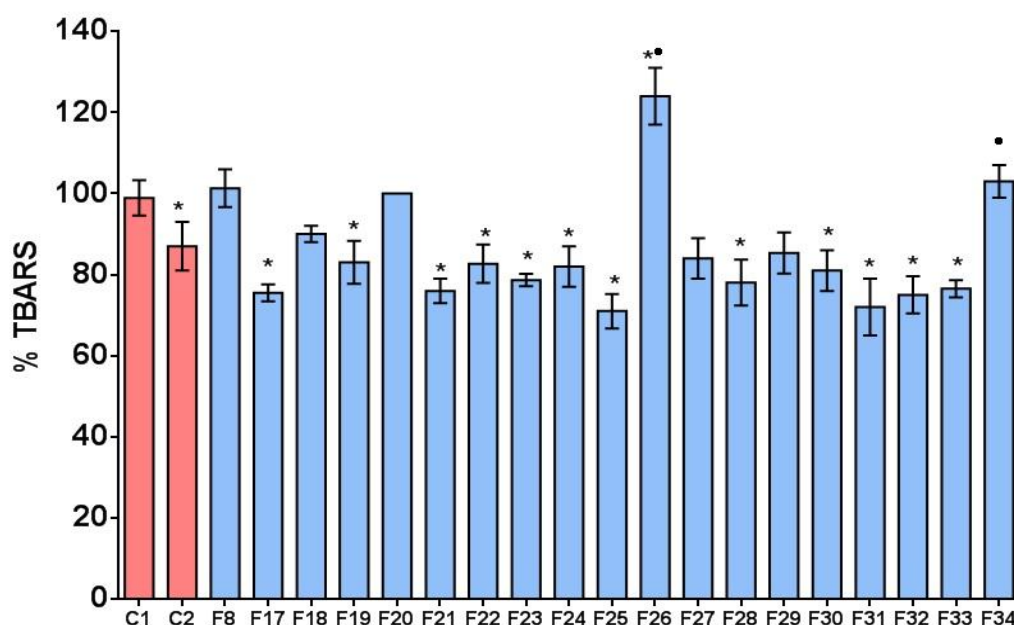


Figura 3.19. Contenido de TBARS (% respecto a C1) en presencia de fracciones FPLC de Ad. Los resultados se expresan como el promedio  $\pm$  SD de al menos 2 determinaciones. \*indica diferencias significativas con C1, •indica diferencias significativas con C2 ( $p < 0,05$ ).

Las células tratadas con las fracciones 17, 19, 21-25, 28 y 30-33 presentaron menores ( $p < 0,05$ ) contenidos de TBARS (75 a 83 % respecto a C1), indicando un efecto de estas fracciones previniendo la oxidación intracelular de lípidos inducida por APPH. Ninguna de estas fracciones presentó diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) con respecto a C2, por lo que lograron mantener a las células con su contenido de TBARS en su estado basal. Las fracciones 8, 18, 20, 27, 29 y 34 no lograron disminuir significativamente ( $p > 0,05$ ) la oxidación lipídica inducida. Por otro lado, la fracción 26 presentó un comportamiento particular, el contenido de TBARS fue mayor que en el caso de C1; como se mostró anteriormente, esta fracción presentó una de las concentraciones peptídicas más altas (0,32 mg/mL).

### 3.B.4. Evaluación del efecto de las fracciones de *Ad* sobre la defensa antioxidante celular

Para el análisis del efecto sobre la defensa antioxidante celular también se seleccionaron algunas fracciones, en este caso: F8, F23, F26, F27, F28 y F34. Las mismas corresponden a distintas regiones del cromatograma FPLC y presentaron algunas diferencias en los ensayos anteriores.

#### 3.B.4.1. Actividad de SOD

En la **Figura 3.20** se muestran los resultados obtenidos en la evaluación del efecto de las fracciones seleccionadas sobre la actividad de la enzima SOD. Como se describió anteriormente, no se encontraron diferencias significativas entre el control del nivel basal (C2) y el control de máxima inducción de la oxidación C1. De las 6 fracciones evaluadas, 4 de ellas (F8, F26, F27, F34) no presentaron diferencias significativas con ninguno de los controles. Las fracciones F23 y F28 presentaron una pequeña pero significativa disminución ( $p < 0,05$ ) de actividad SOD (94 % respecto a C1). Teniendo en cuenta estos resultados, podemos decir que si bien el tratamiento con el digerido **Ad** completo no produjo cambios en la actividad de la SOD, algunas de las fracciones constituyentes de dicho digerido serían capaces de producir modificaciones a este nivel.

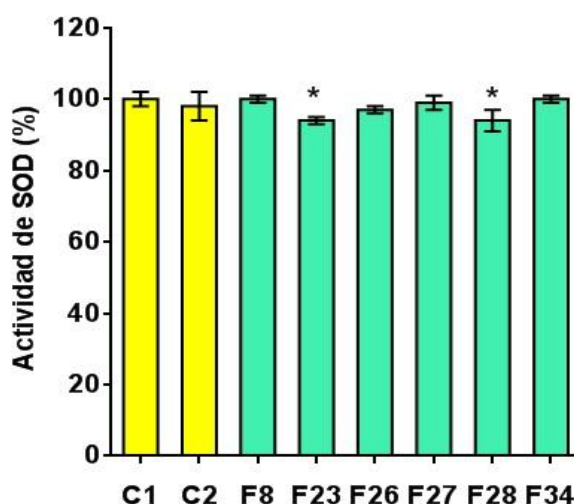


Figura 3.20. Actividad SOD intracelular (% respecto a C1) en presencia de algunas fracciones de **Ad**. Los resultados se expresan como el promedio  $\pm$  SD de al menos 2 determinaciones. Se indican únicamente las diferencias respecto a C1 y C2: \*indica diferencias significativas con C1 ( $p < 0,05$ ).

#### 3.B.4.2. Actividad GPx

Como se describió en la sección 3.A.4.2 no se encontraron diferencias significativas en la actividad GPx de C1 y C2. Sin embargo, se evidenciaron cambios en dicha actividad cuando las células fueron preincubadas con las fracciones: en el caso de F34 se registró una disminución significativa ( $p < 0,05$ , 27 % respecto a C1); mientras que F8 y F23 presentaron aumentos significativos e importantes ( $p < 0,05$ ) de la actividad GPx (**Figura 3.21**).

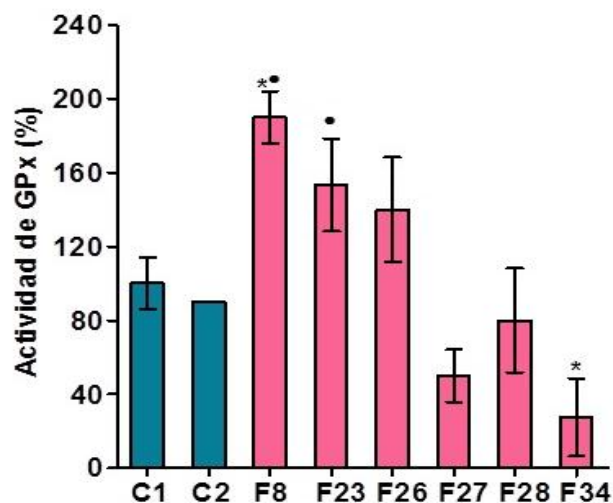


Figura 3.21. Actividad GPx intracelular (% respecto a C1) en presencia de algunas fracciones de **Ad**. Los resultados se expresan como el promedio  $\pm$  SD de al menos 2 determinaciones. Se indican únicamente las diferencias respecto a C1 y C2: \*indica diferencias significativas con C1, \*indica diferencias significativas con C2 ( $p < 0,05$ ).

### 3.B.4.3. Contenido de GSH intracelular

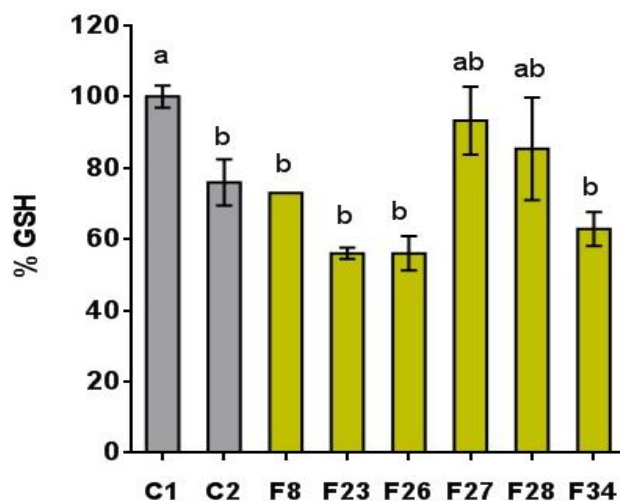


Figura 3.22. Contenido de GSH intracelular (% respecto a C1) en presencia de algunas fracciones de **Ad**. Los resultados se expresan como el promedio  $\pm$  SD de al menos 2 determinaciones. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Como se describió en la sección 3.A.4.3, los controles C1 y C2 presentaron una diferencia significativa ( $p > 0,05$ ) en el contenido de GSH intracelular. Al inducir la oxidación luego de haber tratado las células con algunas de las fracciones evaluadas (F8, F23, F26 y F34) se evidenció una

disminución significativa ( $p < 0,05$ ) del contenido de GSH respecto a C1, alcanzándose valores similares a los basales (C2) (**Figura 3.22**). En el caso de las fracciones 27 y 28 no produjeron cambios significativos ( $p > 0,05$ ) respecto al control C1.

#### 3.B.4.4. Efecto sobre el daño de membrana y mitocondrias celulares.

Nuevamente, para esta determinación se seleccionaron algunas fracciones correspondientes a distintos picos del cromatograma de FPLC (F8, F23, F26, F28 y F34). En la **Tabla 3.9** se muestra la proporción de células correspondientes a cada población (ver **Tabla 3.6**) evaluada luego de la inducción de la oxidación con  $\text{H}_2\text{O}_2$  500  $\mu\text{M}$  (1 h) para C1, C2 y las células previamente incubadas con las fracciones. Como se mencionó cuando se presentaron los resultados para **Ad**, no se encontraron diferencias significativas entre las distintas poblaciones celulares determinadas por las marcaciones con IP y Rd123 (**Tabla 3.6**) entre los controles C1 y C2. En el caso de los sistemas tratados con las fracciones de **Ad**, tampoco se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en las proporciones de las 4 poblaciones con respecto a los controles (**Tabla 3.9**)

Tabla 3.9. Proporción de las distintas poblaciones celulares

%	Sistema						
	C1	C2	F8	F23	F26	F28	F34
Q1	$0,8 \pm 0,8$	$1 \pm 1$	$0,3 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,1$	$0,48 \pm 0,04$	$0,3 \pm 0,2$	$0,5 \pm 0,4$
Q2	$15 \pm 3$	$12 \pm 3$	$16,0 \pm 0,3$	$17 \pm 5$	$12 \pm 8$	$19 \pm 4$	$12 \pm 2$
Q3	$81 \pm 4$	$81 \pm 8$	$82 \pm 2$	$80 \pm 5$	$79,6 \pm 0,8$	$78 \pm 3$	$80 \pm 9$
Q4	$3 \pm 2$	$6 \pm 5$	$2 \pm 2$	$2,7 \pm 0,2$	$7,5 \pm 7,2$	$3 \pm 1$	$8 \pm 7$

Se muestran los promedios  $\pm$  SD de al menos 2 determinaciones.

A modo de ejemplo se muestra el gráfico de fluorescencia con los cuatro cuadrantes obtenidos para uno de los replicados correspondientes a la fracción F8 (Figura 3.22) junto con un replicado de cada uno de los controles.

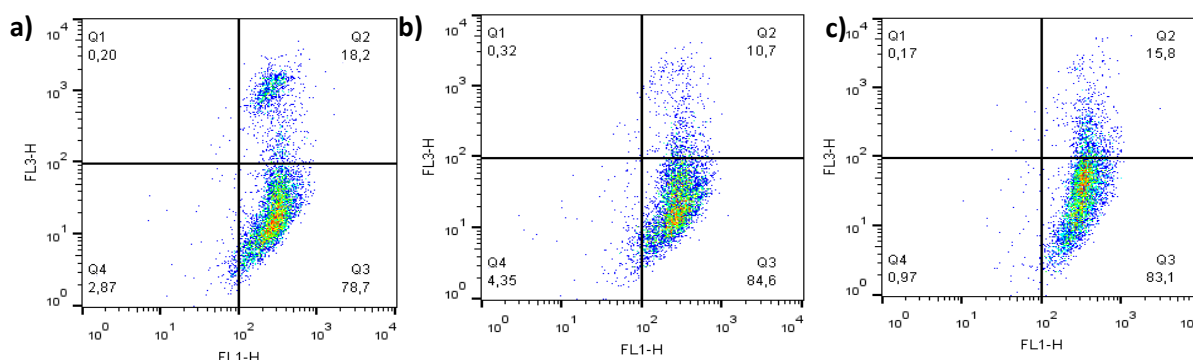


Figura 3.22. Gráficos de fluorescencia FL-3 (IP) vs FL-1 (Rh123) obtenidos por citometría de flujo: a) C1, control de máxima oxidación y b) C2, control de oxidación basal y c) fracción 8 de Ad.

### 3.C. EFECTO DE LOS PÉPTIDOS SINTÉTICOS EN LA PREVENCIÓN DEL DAÑO OXIDATIVO INTRACELULAR.

Finalmente, también se analizó la actividad intracelular de los 10 péptidos sintéticos derivados de la globulina 11S de amaranto y previamente caracterizados en el Capítulo 1. Se realizaron los mismos ensayos de actividad antioxidante intracelular que para el caso de **Ad** y sus fracciones de FPLC. En todos los casos se prepararon soluciones 1 mg/mL de cada péptido en buffer fosfato 35 mM pH 7,8 y se tomó el volumen correspondiente a cada determinación según se describió en la sección de Materiales y Métodos.

#### 3.C.1. Citotoxicidad de los péptidos

En la **Tabla 3.9** se muestra la citotoxicidad de los péptidos sintéticos determinado por el método de determinación de la actividad LDH.

*Tabla 3.9. Citotoxicidad de los péptidos (1 mg/mL) por el método de LDH.*

Péptido	Secuencia	% LDH
1	TEVWDSNEQ	9 ± 2
2	IYIEQGNGITGM	4 ± 1
3	GDRFQDQHQ	8 ± 1
4	LAGKPQQEHSGEHQ	6 ± 2
5	YLAGKPQQEH	8 ± 1
6	LQAEQDDR	8 ± 1
7	HVIKPPSRA	10 ± 3
8	AWEEREQGSR	7 ± 1
9	AVNVDDPSK	7 ± 3
10	KFNRPETT	6 ± 4

En todos los casos, los valores de actividad % de LDH fueron  $\leq$  a 10 % indicando que, aún a esta concentración relativamente alta, los péptidos no generaron daño significativo en la viabilidad celular. Estos resultados experimentales corroboran la predicción *in silico* de toxicidad de los péptidos informada en el Capítulo 1 (sección 1.C.3) que indicaba que ninguna es tóxica para las células.

#### 3.C.2. Evaluación del efecto de los péptidos en el contenido de ROS intracelulares

En la **Figura 3.23** se muestran los resultados del contenido % de ROS en células preincubadas con los distintos péptidos. Los péptidos 8 y 9 no presentaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ )

respecto de C1. Por otro lado, los péptidos P1, P2, P3, P4, P7 y P10 presentaron una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) en el contenido intracelular de ROS respecto de C1, sin diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) con C2, indicando que estos 6 péptidos lograron inhibir la formación y/o neutralizar ROS manteniendo a la célula en su estado de oxidación basal. Estos péptidos lograron una inhibición de entre 32 y 42 %, o sea el contenido estuvo entre 58 y 68 %, con respecto a C1. Por otro lado, si bien los péptidos 5 y 6 lograron disminuir significativamente ( $p < 0,05$ ) el % de ROS con respecto a C1 no fue suficiente para retornar a la célula a su estado basal de oxidación. Estos dos péptidos presentaron un porcentaje de inhibición de ROS de 21 y 22 %, respectivamente.

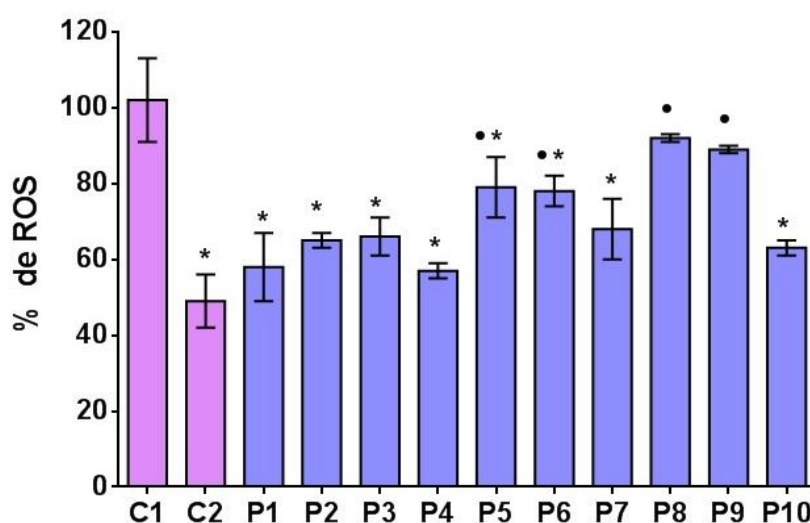


Figura 3.23. Contenido de ROS intracelulares (% respecto a C1) en presencia de péptidos. Los resultados se expresan como el promedio  $\pm$  SD de al menos 2 determinaciones. Se indican únicamente las diferencias respecto a C1 y C2: \*indica diferencias significativas con C1, \*indica diferencias significativas con C2 ( $p < 0,05$ ).

### 3.C.3. Efecto de los péptidos en la oxidación lipídica

En la **Figura 3.24** se presenta el efecto del tratamiento con los 10 péptidos sobre la formación de productos secundarios de la oxidación lipídica inducida por AAPH 1 mM (24 h) en las células Caco-2 TC7. El único péptido que fue capaz de disminuir el valor de TBARS fue P6 (80 % con respecto a C1); indicando que este péptido protegió a las células de la oxidación lipídica manteniendo los valores en su nivel basal (igual a C2).

Yours y col. (2016) demostraron el efecto antioxidante de péptidos presentes en la yema de huevo (WYGPD, TMFPSA y WIHNENQGF) contra el estrés oxidativo inducido por t-BOOH en células Caco-2; los péptidos inhibieron la producción de ROS intracelular (60 %) y la producción de MDA. La actividad antioxidante de estos péptidos fue atribuida a la presencia de aminoácidos hidrófobos tirosina (Y) y triptófano (W). En nuestro caso, P6 no contiene ningún aminoácido aromático, aunque si cuenta con una Leu en el extremo N-terminal y un arginina en el C-terminal que podrían aportar a su actividad de neutralización.

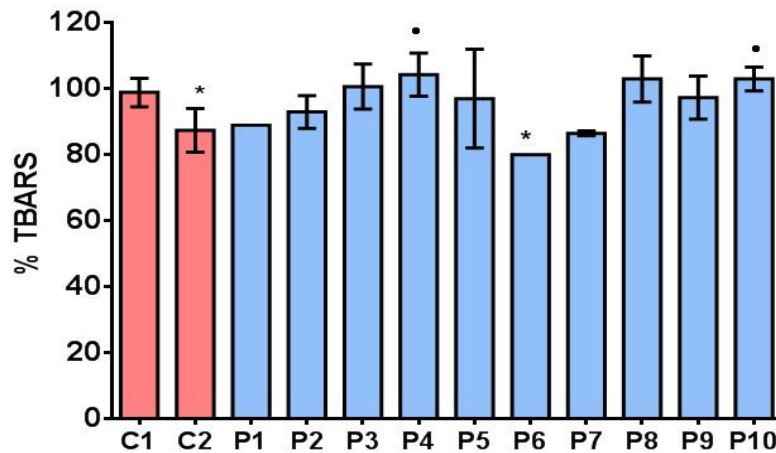


Figura 3.24. Contenido de TBARS intracelulares (% respecto a C1) en presencia de péptidos. Los resultados se expresan como el promedio  $\pm$  SD de al menos 3 determinaciones. Se indican únicamente las diferencias respecto a C1 y C2: \*indica diferencias significativas con C1, • indica diferencias significativas con C2 ( $p < 0,05$ ).

### 3.C.4 Efecto de los péptidos sobre las defensas antioxidantes celulares

Para el análisis de la acción de los péptidos sintéticos se realizó, como en los casos anteriores, la evaluación sobre SOD, GPX y contenido de GSH en lisados de células preincubadas con las muestras y luego con  $H_2O_2$  500  $\mu$ M.

#### 3.C.4.1. Actividad de SOD

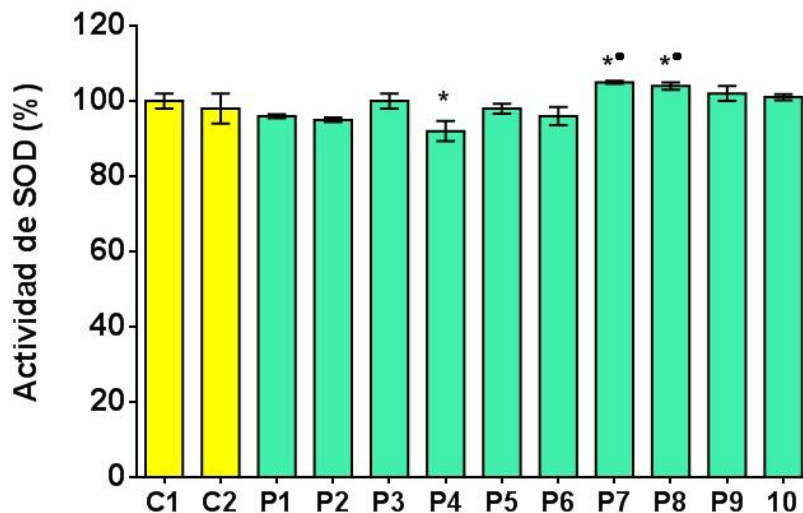
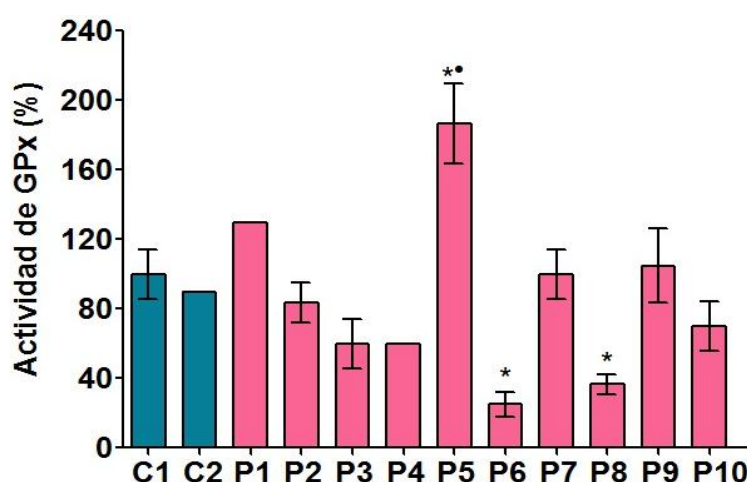


Figura 3.24. Actividad SOD intracelular (% respecto a C1) en presencia de los péptidos. Los resultados se expresan como el promedio  $\pm$  SD de al menos 2 determinaciones. Solo se muestran las diferencias entre las fracciones y los controles: \* indica diferencias significativas con C1, • indica diferencias significativas con C2 ( $p < 0,05$ ).

Los resultados obtenidos en la determinación de la actividad SOD se muestran en la **Figura 3.24**. Como se dijo anteriormente, no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre C1 y C2. De todos los péptidos evaluados, solo el 4 presentó una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) de la actividad con respecto a C1 y no presentó diferencia con C2. Por otro lado, los péptidos 7 y 8 presentaron una actividad SOD significativamente mayor que C1 y C2.

### 3.C.4.2. Actividad de GPx

Si bien no se encontraron diferencias significativas entre los controles de oxidación, se evidenció una disminución importante y significativa ( $p < 0,05$ ) de la actividad de la GPx en el caso de pretratamiento con P6 y P8, con valores finales de actividad de 25 y 37 % respectivamente, con respecto a C1. Por otro lado, P5 indujo un comportamiento opuesto, con un aumento de la actividad GPx respecto a C1 y C2 (**Figura 3.25**).



*Figura 3.25. Actividad GPx intracelular (% respecto a C1) en presencia de los péptidos. Los resultados se expresan como el promedio  $\pm$  SD de al menos 2 determinaciones. Solo se muestran las diferencias entre las fracciones y los controles: \* indica diferencias significativas con C1, \*\* indica diferencias significativas con C2 ( $p < 0,05$ ).*

### 3.C.4.3. Contenido de GSH intracelular

En la **Figura 3.26** se muestran los resultados del contenido de GSH. La preincubación con siete de los péptidos (P1, P2, P4, P5, P6, P8, P9) llevó a un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) de GSH respecto a C1. P1 y P2 fueron los que presentaron los mayores incrementos (casi 90 %). Por otra parte, P3, P7 y P10 no presentaron diferencias significativas respecto a C1.



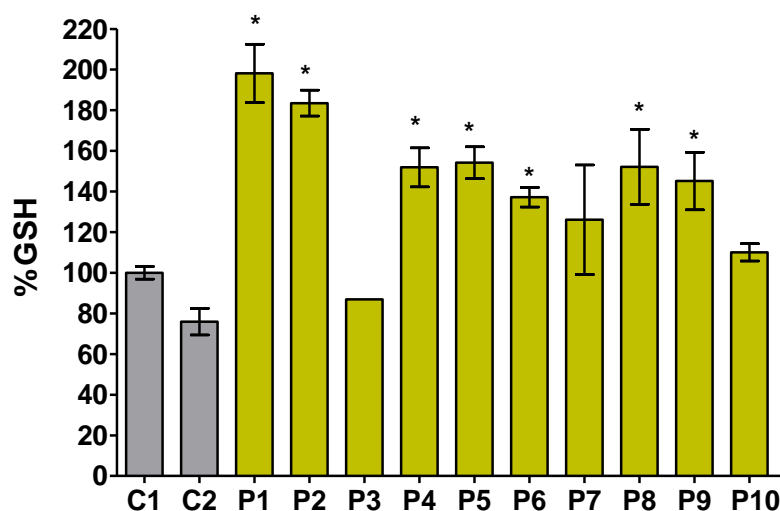


Figura 3.26. Contenido de GSH intracelular (% respecto a C1) en presencia de péptidos. Los resultados se expresan como el promedio  $\pm$  SD de al menos 2 determinaciones. Solo se muestran las diferencias entre las fracciones y los controles: \*indica diferencias significativas con C1, \*indica diferencias significativas con C2 ( $p < 0,05$ ).

#### 3.C.4.4 Efecto protector de los péptidos sintéticos sobre el daño en la membrana y mitocondria celulares.

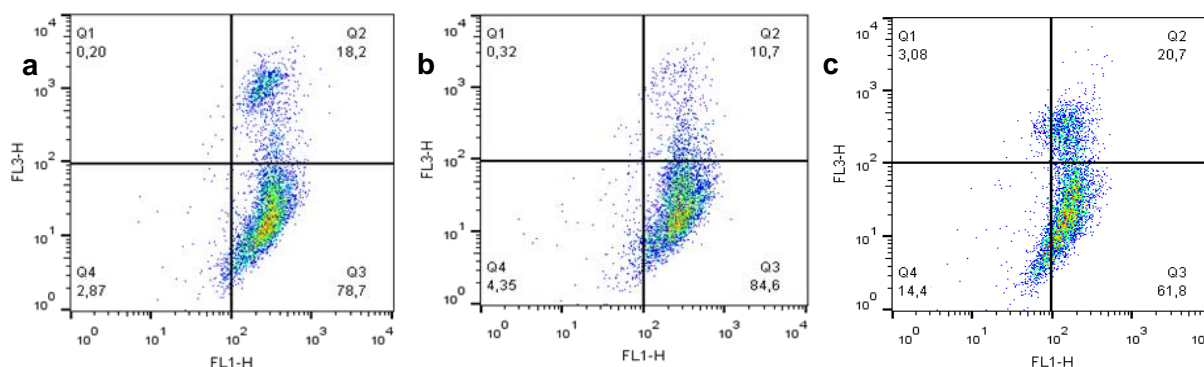
Tabla 3.10. Proporción de las distintas poblaciones celulares luego de la marcación con IP y Rh123

%	C1	C2	P1	P2	P3	P4
Q1	0,8 $\pm$ 0,8	1 $\pm$ 1	0,2 $\pm$ 0,1	0,1	2 $\pm$ 2	0,22 $\pm$ 0,01
Q2	15 $\pm$ 3	12 $\pm$ 3	12 $\pm$ 4	22	21 $\pm$ 1	17 $\pm$ 1
Q3	81 $\pm$ 4	81 $\pm$ 8	83 $\pm$ 5	75	66 $\pm$ 6	80 $\pm$ 2
Q4	3 $\pm$ 2	6 $\pm$ 5	5,0 $\pm$ 0,5	2	11 $\pm$ 5	2,2 $\pm$ 0,9
%	P5	P6	P7	P8	P9	P10
Q1	0,5 $\pm$ 0,5	2,3 $\pm$ 0,4	0,5 $\pm$ 0,3	0,4 $\pm$ 0,3	0,5 $\pm$ 0,2	0,19 $\pm$ 0,01
Q2	16 $\pm$ 11	20 $\pm$ 6	18 $\pm$ 3	19,7 $\pm$ 0,8	15 $\pm$ 3	14 $\pm$ 10
Q3	78 $\pm$ 14	65 $\pm$ 7	74 $\pm$ 7	74 $\pm$ 6	76 $\pm$ 4	82 $\pm$ 7
Q4	6 $\pm$ 2	12,6 $\pm$ 0,1	8 $\pm$ 4	6 $\pm$ 6	8,0 $\pm$ 0,2	4 $\pm$ 3

Los resultados se muestran como promedio  $\pm$  SD de 2 determinaciones.

Por último se evaluó el efecto de los péptidos sobre el daño a nivel mitocondrial y a nivel de la membrana plasmática mediante marcación con IP y Rh 123 y citometría de flujo. En la **Tabla 3.10**

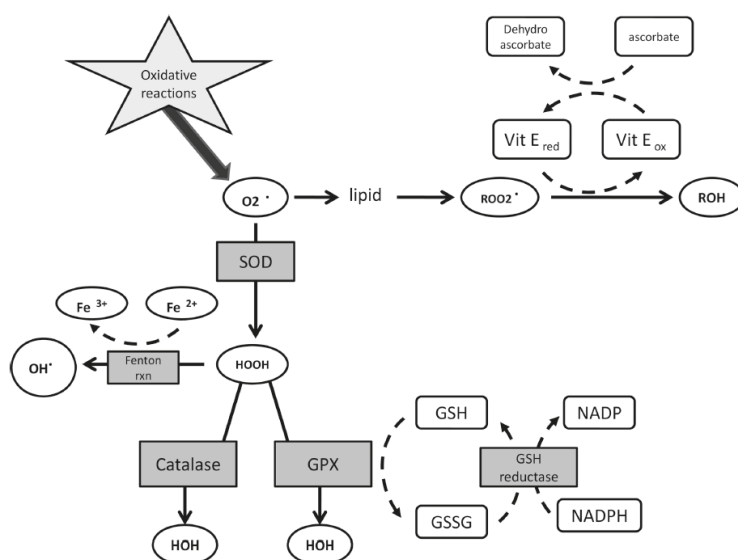
se muestra la proporción de células correspondientes a cada población celular (ver **Tabla 3.6**) para los distintos sistemas. De igual manera que ocurrió con Ad y con las fracciones de Ad, tampoco se encontraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre las 4 poblaciones celulares para ninguno de los péptidos respecto a los controles. En la **Figura 3.27** se muestra, a modo de ejemplo uno de los gráficos de fluorescencia obtenidos para P3; en este caso, al igual que en para el péptido 6, se observó un comportamiento que sugiere una menor población en Q3 (**Tabla 3.10**), esto es, una menor proporción de células vivas y sin ningún tipo de daño; sin embargo, la estadística no arrojó diferencias significativas ( $p > 0,05$ ).



*Figura 3.27. Gráficos de fluorescencia, FL-3 (IP) vs FL-1 (Rh123,) obtenidos por citometría de flujo: a) C1, control de máxima oxidación; b) C2, control de oxidación basal; c) Péptido 3.*

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En la **Figura 3.28** se encuentra un resumen de la “visión tradicional” de la red de defensa celular antioxidante. Estos mecanismos de defensa incluyen antioxidantes “directos” que son pequeñas moléculas (tales como vitamina E y vitamina C) y que tienen la capacidad de finalizar la cadena de radicales libres (“chain-breaking”). Ensayos como ORAC miden esta capacidad. También incluye enzimas antioxidantes “directas” que actúan para mantener las ROS en niveles reducidos que no afecten la supervivencia del organismo, tales como superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx), esta última utiliza glutatión reducido (GSH) como cofactor (Framrose y col., 2008; Finley y col., 2011). El GSH puede además interactuar directamente con ROS tales como  $\text{OH}\cdot$ ,  $\text{ROO}\cdot$  y  $\text{RO}\cdot$ , transformándose en un radical glutatión que luego puede ser regenerado a su forma reducida (Kohen y Nyska, 2002).



*Figura 3.28. Visión tradicional de la defensa antioxidante (Finley y col., 2011)*

Existe mucha evidencia epidemiológica que muestra que alimentos ricos en antioxidantes disminuyen el riesgo de enfermedades crónicas. Sin embargo, en muchos casos, los ensayos de intervención utilizando los compuestos bioactivos específicos no logran probar los efectos beneficiosos. Entre las causas de estas discrepancias se sugieren limitaciones de la teoría antioxidante “tradicional”. Esto es, además de la neutralización directa de los radicales, la función antioxidante también puede involucrar efectos sobre la expresión de múltiples genes que codifican enzimas antioxidantes, secuestro de prooxidantes, modificación de la proporción de sustratos reductores, o inducción de señales celulares. Por otra parte, frecuentemente los beneficios en la salud de los antioxidantes presentes en la dieta ocurren en respuesta a bajos niveles de exposición. Además, un cierto nivel de ROS es necesario para estimular algunos de estos procesos, y la remoción de demasiadas ROS tendría implicancias negativas en el organismo (Finley y col., 2011).

Las células eucariotas han desarrollado un arreglo de genes de defensa inducibles que resultan en la neutralización de eventos de estrés oxidativo, incrementando la supervivencia de las células. Las rutas de transducción de señales responsables de sensar el estrés oxidativo y activar los genes de defensa apropiados involucran el factor de transcripción Nrf2, el cual es activado por ROS. Nrf2 reconoce el elemento de respuesta antioxidante (ARE) que actúa en la promoción de más de 2000 genes target. Bajo condiciones normales basales, Nrf2 está unido a su inhibidor, la proteína asociada a citoesqueleto Keap1, la cual reprime Nrf2 facilitando su degradación proteosomal. Cuando las células son expuestas a compuestos oxidantes que generan estrés oxidativo, se impide la ubiquitinación de Nrf2 incrementando su traslocación al núcleo y alterando las velocidades de entrada/salida del núcleo. Este proceso es seguido por heterodimerización con otros factores de transcripción (Jun y Maf) lo cual resulta en un aumento en la transcripción de enzimas antioxidantes mediada por Nrf2-ARE (**Figura 3.29**). Nrf2 participa en la activación de las enzimas antioxidantes directas previamente mencionadas, así como en la activación de las enzimas detoxificantes (conjugantes) de fase II clasificadas como antioxidantes “indirectos” en base a su rol en mantener el balance redox y la homeostasis de los tioles. Estas últimas contribuyen a la biosíntesis y reciclado de tioles (glutatión S-transferasa, glutatión reductasa GR), y facilitan la excreción de metabolitos secundarios reactivos u oxidados (quinonas, epóxidos, aldehídos, peróxidos) a través de reducción/conjugación (quinina oxido-reductasa NQO1, glutamil-cisteína ligasa GCLC, UDP-glucuronosiltransferasa UGT). Los tioles tienen una importante capacidad redox, el balance entre tioles oxidados y reducidos puede jugar un rol clave en la regulación de diversas rutas celulares asociadas con la oxidación. También, Nrf2 está íntimamente involucrado en la regulación del hierro intracelular a través de genes que contienen ARE y codifican para ferritina (almacenamiento), hemo-oxigenasa-1 (catabolismo del grupo hemo), ferroportina (exportación de hierro intracelular) (Framrose y col, 2008; Filey y col., 2011). Las ROS intracelulares pueden estimular la expresión génica de enzimas antioxidantes y proteínas inmunoreactivas (citoquinas quimoquinas, factores de transcripción), involucrando diversas rutas de señalamiento celular (factor nuclear (NF)κB, MAPK, p53, entre otros) (Finley y col., 2011). Las ROS pueden influenciar la unión de los factores de transcripción de varias maneras: a) activación de quinasas y de cascadas de señales por fosforilación secuencial; b) modulación de la actividad fosfatasa; c) control de la síntesis y degradación de factores de transcripción. Las ROS también pueden modular la actividad de enzimas del ciclo de Krebs que generan NADH y FADH<sub>2</sub> influenciando así la producción de anión superóxido y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la cadena transportadora de electrones. Esta ruta provee feedback sobre la producción de ROS e indirectamente influencia la señalización redox (Framrose y col., 2008). El balance redox celular condiciona tanto la neutralización de ROS como las señales para la apoptosis cuando el grado de daño excede la capacidad de reparación celular (Finley y col, 2011).

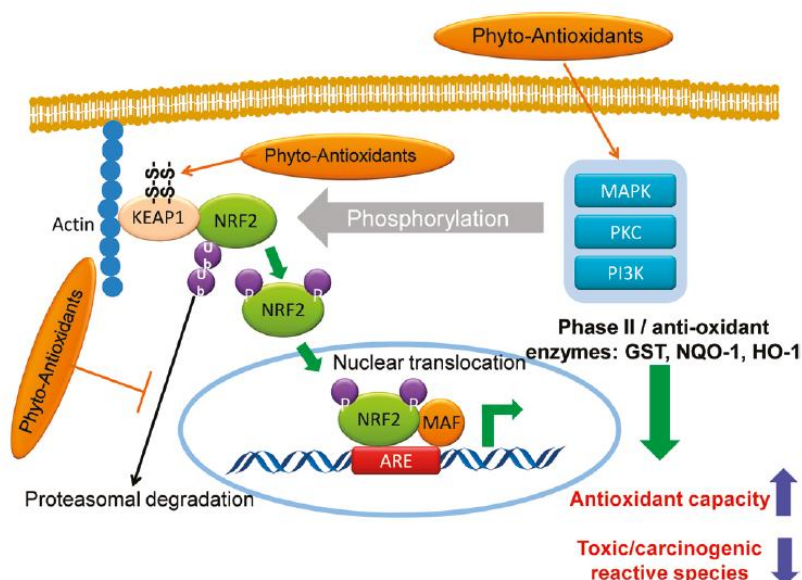


Figura 3.29. Actividad antioxidante mediada por activación génica a través del promotor ARE (Finley y col., 2011)

Es importante remarcar que se ha demostrado que estas rutas de señalización celular son activadas por agentes específicos (como el  $H_2O_2$ ) y no por el estrés oxidativo general. Por lo tanto, el efecto de cada antioxidante será dependiente de su acción sobre esos agentes específicos (Framrose y col., 2008). Células sometidas a diferentes estresores han mostrado tener consecuencias fisiológicas muy diferentes y específicas debido a que diversas funciones son únicamente requeridas para la resistencia frente a una ROS. Los cambios en respuesta a  $H_2O_2$  incluyen, en común con otros agentes estresores, la inducción de sistemas de detoxificación (tioredoxina y glutatión) así como enzimas antioxidantes (catalasa y superóxido dismutasa). Sin embargo, una cadena respiratoria intacta es un requerimiento específico de defensa frente a  $H_2O_2$  dado que su presencia durante una producción aumentada de superóxido puede ser crítica debido a la formación de radical hidroxilo (Thorpe y col., 2004). Baud y col. (2004) demostraron que la catalasa tiene un valor de  $K_m$  para la remoción de  $H_2O_2$  mucho mayor que la glutatión peroxidasa, indicando un menor nivel de actividad de la CAT frente a GPx. Muchos estudios sugieren que lo más importante es el balance redox, y la modificación de este balance tanto hacia la oxidación como hacia la reducción puede ser negativo. Este concepto es apoyado por la teoría de la *hormesis* que postula que es necesario un cierto nivel (bajo) de ROS para desencadenar las respuestas antioxidantes. Por lo tanto, la remoción de demasiadas ROS puede no ser benéfica para un organismo (Finley y col., 2011). Tomando como base estos conocimientos, se intentará explicar los resultados obtenidos en este trabajo.

En primer lugar, analizaremos los sistemas control a fin de evaluar el efecto que tuvo el inductor de estrés ( $H_2O_2$  500  $\mu M$ , 1 h) en las células Caco-2 TC7. Al comparar las células en su estado basal (C2) con las células inducidas (C1) pudo registrarse un aumento importante en el contenido

*de ROS intracelulares y un aumento en el contenido de GSH por efecto del tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Sin embargo, las enzimas SOD y GPx no presentaron modificaciones. Tampoco hubo un aumento significativo en la oxidación lipídica en estas condiciones de inducción, pero sí fue evidente cuando se realizó un tratamiento con AAPH 1 mM durante 24 h. Por citometría de flujo pudo evidenciarse que este estresor no indujo daño mitocondrial ni en la integridad de la membrana plasmática.*

Ryu y col. (2011) demostraron que células fibroblásticas humanas tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 500 µM durante 2 h mostraron un aumento de ROS intracelulares pero además presentaron una disminución en el contenido de las enzimas SOD y CAT. En otro caso, el tratamiento de células HepG2 con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 500 µM durante 6 h indujo aumento de ROS, pérdida de viabilidad, disminución de CAT y GR, sin cambios en SOD y GSH (Wang y col., 2016). Si bien la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilizada en estos estudios fue la misma que en nuestro caso, el tiempo de exposición fue mayor y fundamentalmente se utilizaron otras células, lo cual podría explicar las diferencias de comportamiento. En estudios realizados sobre células Caco-2 utilizando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en mayores concentraciones se observó pérdida de integridad mitocondrial, disturbios en la funcionalidad mitocondrial y muerte celular como manifestaciones de la citotoxicidad producida por difusión de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a la mitocondria. En presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5 mM (2 h), se informó además que no se vieron modificados los niveles de GSH intracelular, lo cual fue explicado a través de una inhibición de la GPx como una respuesta celular de adaptación al estrés oxidativo (Laparra y col., 2008). Además, los mismos cultivos tratados con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5 mM (1 h) presentaron un aumento de la actividad SOD (Cilla y col., 2008). En otro estudio, células Caco-2 tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 4 mM durante 1,5 o 3 h mostraron reducción de la viabilidad y aumento de ROS intracelulares (García Nebot y col., 2014). Similar comportamiento fue registrado con tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM durante 6 h (Shi y col., 2014). En este último caso, al igual que en otro estudio donde se realizó el tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5 mM durante 2 h (García-Nebot y col., 2011) se observó un aumento en el contenido de MDA. Por lo tanto, si bien se observa una amplia diversidad de respuestas frente a diferentes condiciones de inducción del estrés oxidativo, en función de estos antecedentes podemos concluir que tratamientos con mayores concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y/o tiempos de contacto que los utilizados en este trabajo, logran superar las defensas antioxidantes celulares llegando a producir daño y disminución apreciable de viabilidad.

*De acuerdo con nuestros resultados, podemos postular que el tratamiento realizado indujo un aumento de ROS intracelulares, la acción de la GPx sobre el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracelular consume GSH provocando un desbalance de GSH/GSSG lo cual pudo haber inducido una respuesta celular rápida relacionada con aumento de GSH. Esta respuesta podría involucrar a la glutatión reductasa que es una enzima constitutivamente activa e inducible por estrés oxidativo (Ryu y col., 2011; Shi*

y col., 2014). Por otra parte, el efecto oxidante no fue tan agresivo como para superar las defensas propias de la célula y producir daños y pérdida de viabilidad.

Se ha demostrado que diversas sustancias exhiben actividad antioxidante funcionando como inductores y/o señales celulares que llevan a cambiar la expresión génica. Bajo el tratamiento con antioxidantes, Nrf2 es liberado de Keap1 y trasloca al núcleo iniciando la activación (up-regulation) de los genes antioxidantes (**Figura 3.29**, Finley y col., 2011). Entre las sustancias que han mostrado estos efectos pueden mencionarse flavonas y compuestos relacionados, compuestos fenólicos, butilhidroxianisol (BHA), compuestos derivados de crucíferas (en estos últimos se demostró específicamente una elevación de la enzima de fase II glutatión S-transferasa) (Finley y col., 2011). Sin embargo, también se encuentran en la literatura varios trabajos donde se han estudiado estos aspectos para antioxidantes peptídicos, como se discutirá a continuación.

Hidrolizados de caseínas obtenidos por acción de diversas proteasas presentaron efectos en células Jurkat T (no sometidas a ningún agente estresor), tales como aumento en el contenido de GSH y de la actividad catalasa, sin cambios en la actividad SOD. Los efectos fueron diferentes entre hidrolizados obtenidos con distintas proteasas pero que tenían concentraciones proteicas comparables (Phelan y col., 2009).

Péptidos derivados de un alga (10–100 µg/ml, preincubación durante 24 h) lograron disminuir las ROS y aumentar la expresión de SOD y catalasa en células fibroblásticas sometidas a estrés por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 500 µM (2 h). El efecto sobre las enzimas fue dependiente de la fracción peptídica evaluada. Los niveles de GSH no se vieron modificados por la presencia de los péptidos. Además, estos autores demostraron un aumento de la expresión de las enzimas antioxidantes a través de la inhibición de la activación del factor NF-κβ inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; el mecanismo sugerido para esta inhibición fue una acción de neutralización de ROS por parte los péptidos (Ryu y col., 2011).

Wang y col. (2015) estudiaron la actividad antioxidante de dos fracciones peptídicas, una con masa molecular inferior a 1 kDa y la segunda con masas moleculares entre 1 y 3 kDa, obtenidas por hidrólisis con alcalasa de un subproducto del maíz. La inducción de la oxidación se realizó con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1mM (6 h) en células Caco-2 pretratadas con las muestras (2 h). Ambas fracciones lograron disminuir el contenido de ROS intracelulares en una forma dosis dependiente con concentraciones entre 0,05 y 1 mg/mL. En otro trabajo con estas mismas fracciones, pero aplicadas a células HepG2 inducidas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 500 µM (6 h), se observó también un descenso de ROS intracelulares y un aumento de viabilidad celular. Además, para concentraciones de 2,5 mg/mL, estas fracciones peptídicas indujeron un aumento de la actividad SOD, CAT y GR, así como un aumento de GSH. Los péptidos constituyentes identificados en una de las fracciones presentaron masas moleculares entre 500 y 900 Da, siendo uno de los péptidos identificados GLLLPH (Gly-Leu-Leu-Leu-Pro-His). También pudo evidenciarse que los péptidos no presentaron ningún efecto sobre células que no fueron tratadas con un agente estresor, por lo que los autores sugirieron que los mismos fueron

capaces de activar las rutas de señales celulares y expresión génica solamente en presencia de estrés oxidativo (Wang y col., 2016).

Un pretratamiento con hidrolizados (con alcalasa o con proteasa S) de proteínas de cáscara de huevo (0,1 y 0,5 mg/mL) de células Caco-2 inducidas con  $H_2O_2$  (1 mM, 6 h) logró disminuir la formación de MDA llevando a los valores basales de las células, indicando un efecto protector frente a la peroxidación lipídica. También, provocaron un aumento en el contenido de GSH y de la relación GSH/GSSG. Los autores hipotetizaron que este efecto estaría relacionado con un aumento de la síntesis de GSH por promoción de la actividad de  $\gamma$ -GCS, aumento de la actividad GPx, GR y GST, aunque no pudieron establecer claramente como dichas actividades enzimáticas fueron activadas por los hidrolizados (Shi y col, 2014).

Himaya y col. (2012) demostraron que el péptido Leu-Leu-Met-Leu-Asp-Asn-Asp-Leu-Pro-Pro (1301 Da) derivado de gelatina extraída de piel de pescado hidrolizada con pepsina, tripsina y quimotripsina es un inhibidor potente de la oxidación de lípidos (preincubación con las muestras 24 h, tratamiento con AAPH 3 mM 1 h), proteínas (inducción en lisados celulares con  $H_2O_2$  2 mM) y DNA (inducción con  $H_2O_2$  2 mM sobre DNA aislado) en células monocíticas RAW264.7 de ratón. Estos efectos fueron atribuidos a neutralización de ROS intracelulares mediada por el péptido, demostrada luego de preincubar con el péptido (1 h) y del tratamiento con  $H_2O_2$  500  $\mu$ M durante 2,5 h. En células inducidas con  $H_2O_2$  50  $\mu$ M se evidenció aumento en la expresión de m-RNA correspondiente a SOD, catalasa y GSH, por lo que se sugirió que el efecto del péptido estuvo relacionado con una estimulación de la expresión de estos factores antioxidantes.

La lunasina (un péptido de 43 aminoácidos identificado en soja y otras plantas, incluido el amaranto (Silva-Sánchez y col., 2008) (0,5 – 25  $\mu$ M) demostró ejercer un efecto protector en células Caco-2 tratadas con  $H_2O_2$  4 mM (1,5 y 3 h) y t-BOOH 3 mM (1,5 h). Luego de una preincubación con el péptido durante 24 h se evidenció una disminución de ROS y un aumento de la viabilidad celular (García Nebot y col, 2014). En este caso no se analizaron otros parámetros relacionados con las defensas propias de la célula.

Este resumen de algunos de los trabajos existentes en la bibliografía evidencian la gran variabilidad tanto en la forma de inducir el estrés oxidativo, en los parámetros evaluados así como en las respuestas obtenidas por las presencia de péptidos. En primer lugar, es importante destacar que la mayoría de los trabajos no tienen en cuenta aspectos de la biodisponibilidad de los péptidos. Muchos de ellos evalúan hidrolizados obtenidos con enzimas exógenas sin tener en cuenta que esos hidrolizados/péptidos serán sometidos a una digestión gastrointestinal luego de ser ingeridos; y la gran mayoría de los trabajos no consideran los procesos de modificación y absorción de los péptidos en la pared intestinal. En función de estas consideraciones, en este trabajo todas las muestras evaluadas son producto de una digestión gastrointestinal simulada (las limitaciones de este proceso fueron discutidas en el Capítulo 1) y además se estudió la posible modificación y absorción intestinal de algunas de las muestras como se discutirá más adelante (Capítulo 4).



*En nuestro diseño experimental, así como en todos los trabajos previamente mencionados, el tratamiento con la muestra se realizó previamente a la inducción del estrés oxidativo. Nuestras hipótesis fueron que los péptidos podrían ingresar a la célula y/o interaccionar con la membrana plasmática induciendo algún cambio intracelular. Así, se pretendió evaluar efectos de moléculas que tengan estas capacidades, descartando acciones directas sobre el estresor fuera de la célula. Además, los péptidos podrían ser modificados (o no) por la presencia de peptidasas extra e intracelulares de las células Caco-2 TC7.*

Luego de un pretratamiento (1 h) con diferentes muestras (Ad, fracciones de Ad, péptidos sintéticos) y una inducción de estrés con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 500 µM (1 h) se obtuvo una variedad muy amplia de combinación de respuestas para los distintos parámetros evaluados (ROS, SOD, GPx, GSH), y TBA (inducción con AAPH 1 mM, 24 h), casi una diferente para cada muestra, las cuáles se resumen en la **Tabla 3.11**. Como respuesta común pudo observarse que todas las muestras fueron capaces de reducir el contenido de ROS intracelulares respecto al sistema control inducido (C1), aunque hubo diferentes niveles de reducción, en algunos casos hasta el nivel basal o en otros a niveles mayores al basal.

*Estos resultados demuestran, en primer lugar, que productos generados por la digestión gastrointestinal de las proteínas de amaranto (ya sea el digerido completo, sus fracciones o péptidos identificados a partir de este digerido) fueron capaces de lograr una inhibición de ROS en células epiteliales intestinales, encontrándose fracciones con alta actividad que logran mantener a las células en sus niveles basales de ROS en un amplio rango de masas moleculares, así como péptidos puros con propiedades fisicoquímicas diferentes.*

Sin embargo, estas reducciones fueron acompañadas de diversos comportamientos de las enzimas antioxidantes SOD y GPx y del contenido de GSH (sin cambios, disminuciones o aumentos para los tres). También pudo observarse variabilidad en la inhibición de la oxidación de lípidos (TBARS) inducida por AAPH, ya que en muchos de los casos no se observaron efectos (ninguno de los péptidos sintéticos, fracciones 8, 26 y 34) mientras que en otros (Ad, fracciones 23, 27 y 28) se observó una disminución hasta el valor basal de TBARS (**Tabla 3.11**).

Ensayos como el descrito en la sección 3.6 (ROS) evalúan la capacidad de los compuestos antioxidantes de reducir el estado oxidativo intracelular pero no dicen nada sobre el mecanismo que utilizan estos compuestos; es decir, esta actividad antioxidante podría estar relacionada con el barrido de algún radical en particular o de varios; también podría actuar inhibiendo la producción de más ROS o reparando el daño oxidativo producido en las biomoléculas. Por esto es necesario ir un poco más allá y evaluar si las muestras actúan inhibiendo una oxidasa (por ejemplo, la NADPH oxidasa que produce superóxido) o induciendo la expresión de alguna enzima antioxidante (por ejemplo, SOD), lo que resulta en la reducción en ambos casos de niveles de

superóxido/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (López-Alarcón y Denicola, 2013). Los cambios en las actividades de las enzimas antioxidantes celulares se pueden considerar como un biomarcador de la respuesta antioxidante. SOD, CAT y GPx son las principales enzimas antioxidantes que minimizan la cascada de ROS y eliminan los peróxidos citotóxicos en las células. De hecho, la actividad de estas enzimas, así como el contenido de GSH y su relación con el contenido GSSG, se utilizan como biomarcadores en el estudio de varias enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo (cáncer, isquemia, enfermedades neurodegenerativas e inclusive el envejecimiento normal) porque son las primeras en indicar el estado redox celular (Yang y Lee, 2015). En este sentido, diversos estudios demuestran que las enzimas antioxidantes pueden ser inducidas por el desarrollo de un estado de estrés oxidativo, provocando un aumento en su nivel o actividad, o consumirse disminuyendo su nivel o actividad (Chang y col., 2014). Dado que las enzimas antioxidantes endógenas están diseñadas para eliminar ROS rápidamente es posible que puedan reaccionar, frente a un aumento de ROS, antes de que lo haga un antioxidante que también es capaz de secuestrar ROS (Fernández-Pachón y col., 2009).

*Tabla 3.11. Resumen de los resultados obtenidos en la evaluación de la actividad antioxidante intracelular.*

Muestra		ROS	SOD	GPx	GSH	TBA
Ad	2,9	dd	0	0	d	dd
	1,16	dd	0	d	0	dd
	0,58	d	0	d	0	dd
Fracciones	8	dd	0	a	0	0
	23	dd	d	a	d	dd
	26	dd	0	0	d	0
	27	dd	0	0	0	dd
	28	dd	d	0	0	dd
	34	d	0	d	d	0
Péptidos	1	dd	0	0	a	0
	2	dd	0	0	a	0
	3	dd	0	0	0	0
	4	dd	d	0	a	0
	5	d	0	a	a	0
	6	d	0	d	a	d
	7	dd	a	0	0	0
	8	0	a	d	a	0
	9	0	0	0	a	0
	10	dd	0	0	0	0

*Se muestran los cambios respecto al control inducido C1*

*d = disminución parcial; dd = disminución a nivel basal o menores*

*0 = sin cambios*

*a = aumento*

En este caso, la disminución de las ROS por acción de los péptidos podría ocurrir:

1) ingresando a la célula y actuando como neutralizadores de ROS en el interior celular.

- 2) ingresando a la célula y produciendo efecto sobre las rutas de señalización que llevan a inducción de enzimas o compuestos antioxidantes.
- 3) interacción con la membrana plasmática e inducción de vías de señalización y activación de enzimas o compuestos antioxidantes.

Si comparamos los resultados obtenidos en la actividad de neutralización de radicales ROO<sup>•</sup> en sistemas acelulares (ORAC y HORAC). Tanto para el ensayo ORAC (neutralización de peróxidos) como HORAC (neutralización de radicales hidroxilo), los péptidos más activos fueron P8, P5, P2 y P1, mientras que P4, P7 y P3 presentaron una potencia mucho menor que el resto e incluso que Ad y las fracciones de Ad. Los péptidos P6, P9 y P10 presentaron muy baja o nula actividad de scavenging en solución (Capítulo 1). El péptido 9 tampoco mostró disminución de ROS intracelulares. Sin embargo, los péptidos 6 y 10 sí presentaron disminución de ROS intracelulares. Además, el péptido 8 con alta actividad en la neutralización de ROS en solución presentaron baja o nula actividad intracelularmente.

*Esta falta de correlación entre ensayos acelulares y celulares podría ser explicada por:*

- *posibles modificaciones sufridas por los péptidos en presencia de las células que cambien la actividad de las moléculas. Este aspecto será estudiado en el Capítulo 4.*
- *acción por mecanismos distintos a la neutralización directa de las ROS. Se ha demostrado falta de correlación entre la capacidad ORAC y la capacidad para controlar el estrés oxidativo intracelular en otros componentes alimentarios, comprobándose en algunos casos un efecto sobre el sistema Nrf2 (Finley y col., 2011). A partir de nuestros resultados podemos inferir algunos efectos de este tipo para algunas de las muestras tales como cambios en las actividades SOD y GPx y en el nivel de GSH. Un efecto registrado para 7 de los 10 péptidos y no para Ad ni para las fracciones de Ad fue un aumento importante del contenido de GSH respecto al sistema inducido control C1. De los 7 péptidos para los que se observó este efecto, 5 correspondieron a casos donde se logró disminuir las ROS a los niveles basales y los otros 2 fueron aquellos que no lograron disminuir las ROS (P8 y P9) (**Tabla 3.11**).*

*Resulta evidente de estos resultados que los productos de digestión del aislado proteico de amaranto tienen la potencialidad de ser benéficos en la prevención del estrés oxidativo de la pared intestinal y que diferentes componentes peptídicos del digerido podrían ejercer su acción mediante diferentes mecanismo/s. Para poder obtener más información acerca de estos mecanismos será interesante realizar similares estudios en sistemas con un mayor grado de estrés oxidativo y/o donde se analicen las defensas celulares a tiempos mayores.*

## **CAPÍTULO 4**

# **SIMULACIÓN DE LA ABSORCIÓN GASTROINTESTINAL DE PÉPTIDOS DE AMARANTO.**

## INTRODUCCIÓN

Así como en la investigación farmacológica, en la investigación relacionada con alimentos funcionales es esencial investigar la biodisponibilidad de los componentes alimentarios potencialmente bioactivos. Muchas veces la información que se obtiene de ensayos *in vitro* de componentes bioactivos puede no resultar valiosa si no se conoce que ocurre *in vivo* con la absorción, distribución, metabolismo y excreción de estos compuestos y las moléculas derivadas. Los péptidos bioactivos son de interés en el desarrollo de alimentos funcionales, ya que muchas proteínas presentes en los alimentos poseen secuencias peptídicas que están inactivas dentro de la proteína intacta pero que pueden ejercer un efecto fisiológico en el cuerpo después de su liberación enzimática (Foltz y col., 2008). Los péptidos bioactivos pueden causar efectos sistémicos y, para ello, deben absorberse desde la luz intestinal, o actuar directamente sobre el tracto intestinal o mediante receptores y señales celulares para mediar su acción (Rutherford-Markwick y Moughan, 2005).

### **Absorción de péptidos bioactivos**

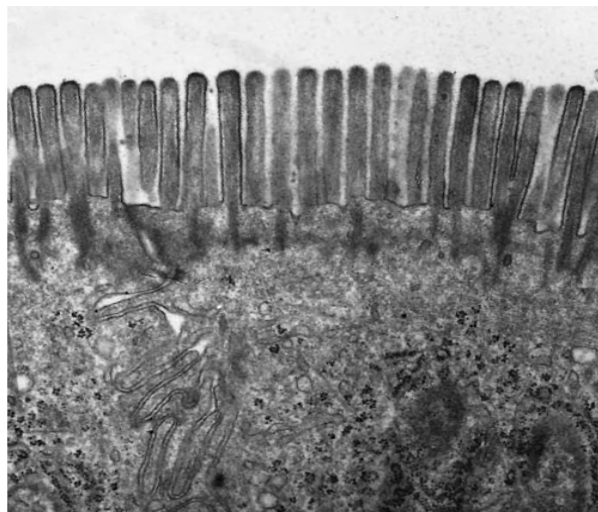
La principal limitación de los péptidos bioactivos como fármacos o nutraceuticos es su baja biodisponibilidad. En este sentido, el reto de los últimos tiempos ha sido obtener péptidos con alta especificidad y que puedan mantener su bioactividad hasta llegar a los receptores, sin degradarse. Los principales factores que afectan la absorción de los péptidos son las diferencias metabólicas, anatómicas, fisiológicas y bioquímicas del tracto gastrointestinal, la actividad enzimática del mismo, la pobre permeabilidad al cruzar las membranas biológicas así como su naturaleza hidrofílica y tamaño molecular. No obstante, algunos fragmentos son parcialmente resistentes a los procesos de hidrólisis y son susceptibles de ser absorbidos en cantidades fisiológicamente activas y alcanzar intactos la circulación sanguínea. Lo anterior, solo es posible si el péptido supera aquellos procesos que pudieran hacerle perder su acción biológica.

#### *Absorción intestinal*

La pared del intestino delgado está formada, comenzando desde la luz intestinal, por la mucosa con su monocapa de células epiteliales prismáticas y la lámina propia de tejido conectivo laxo que le proporciona soporte, nutrición y defensa. Inmediatamente después de la mucosa hay una delgada capa de fibras musculares lisas, la *muscularis mucosae*, que marca el límite entre la mucosa y las demás estructuras de la pared del intestino. Por fuera de la *muscularis*, la submucosa está formada por tejido conectivo más denso por el que transitan vasos sanguíneos arteriales que proporcionan la irrigación sanguínea a la mucosa, y por venas y vasos linfáticos que transportan al resto del organismo los nutrientes absorbidos; en la submucosa hay además numerosos nervios y ganglios del sistema nervioso autónomo. Luego de la submucosa hay dos capas de tejido muscular liso, la interna, denominada circular interna, cuyas fibras musculares

lisas están dispuestas en espirales apretadas en tanto que la más externa, cuyas espirales son muy alargadas, es denominada capa longitudinal externa.

La superficie interna del intestino delgado está caracterizada por repliegues formados por la mucosa y la submucosa, llamados válvulas conniventes o pliegues de Kerkring, cuya orientación es perpendicular a la dirección del lumen. Las válvulas sobresalen de la superficie de la mucosa hasta 10 mm y miden de 25 a 50 mm de largo; su función es favorecer la mezcla del contenido del lumen con las secreciones intestinales, pancreáticas y biliares y hacer más eficiente el proceso de la digestión. El aspecto aterciopelado de la mucosa se debe a las vellosidades intestinales, todas de más o menos igual altura, dispuestas apretadamente y que se proyectan al lumen. Las vellosidades representan aproximadamente tres a cuatro quintos de este espesor de la mucosa (Brunser, 2013). Si bien en las porciones más distales del intestino, el número de vellosidades va disminuyendo progresivamente, su presencia provoca un aumento del área de absorción de hasta diez veces. Las vellosidades representan el compartimiento diferenciado, a cargo de la digestión terminal y la absorción de los nutrientes. Además, cada célula epitelial de la vellosidad intestinal posee un “borde o ribete en cepillo” (**Esquema 4.1.**) formado por alrededor de mil microvellosidades que sobresalen hacia la luz del intestino. Este ribete estriado es la diferenciación citoplasmática distintiva de las células epiteliales intestinales. Está formado por las microvellosidades y sus raíces, por una estructura filamentosa paralela a la superficie luminal del enterocito denominada la malla terminal y por el complejo de unión, que establece contactos íntimos entre los enterocitos contiguos y regula además aspectos importantes de la permeabilidad de la mucosa y del pasaje de moléculas desde y hacia el lumen intestinal.



**Esquema 4.1.** Ribete estriado de enterocito a bajo aumento.  
. (Original x 12000).

Las microvellosidades están dispuestas apretadamente en la superficie luminal de los enterocitos formando conjuntos compuestos por seis microvellosidades en disposición hexagonal más una

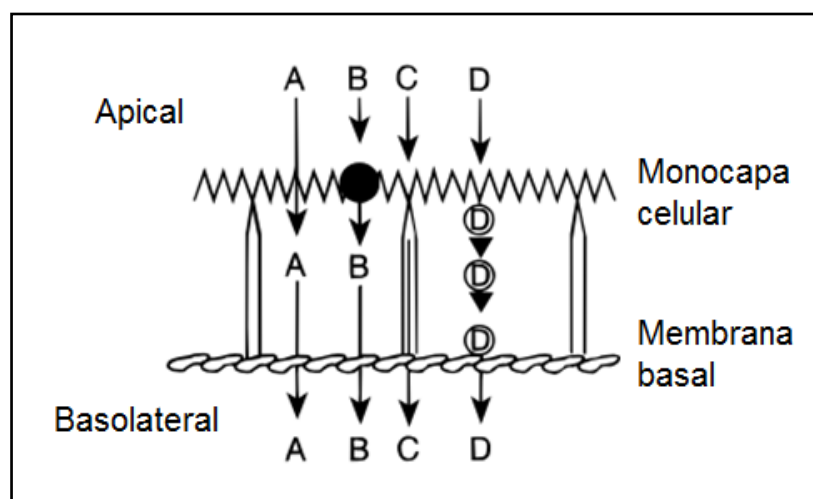
séptima ocupando el centro. En los enterocitos maduros las microvellosidades miden aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  de largo y su diámetro es de aproximadamente 0,08  $\mu\text{m}$ . El incremento de la superficie expuesta producida por las microvellosidades es de al menos veinte veces más. Por lo tanto, la combinación de las válvulas conniventes con las vellosidades y las microvellosidades determina un aumento del área absorptiva de la mucosa de casi mil veces, por lo cual una gran proporción de la absorción de nutrientes ocurre en la zona alta del intestino (Johnson, 2002).

Los péptidos que han resistido el proceso de digestión y llegan intactos al intestino, bien pueden ejercer una función local o, si su acción es sistémica, deben atravesar el epitelio y pasar al torrente circulatorio. Sin embargo, las diferencias metabólicas y las variaciones anatómicas, fisiológicas y bioquímicas que se presentan en las diferentes partes del tracto gastrointestinal repercuten en la absorción de los mismos. Entre los factores fisiológicos, las diferencias en la composición y grosor de la mucosa, el pH, el área superficial, la actividad enzimática, la bilis, el jugo pancreático y el volumen y contenido de fluido, pueden modificar las relaciones de disolución, solubilidad, tiempos de tránsito, metabolismo y transporte de membrana de los péptidos.

La biodisponibilidad de los péptidos depende de la actividad enzimática de las diferentes áreas del tracto gastrointestinal. Como se comentó en el Capítulo 1, la digestión de las proteínas se inicia en el estómago por acción de las pepsinas que junto a la alta acidez del mismo inician la hidrólisis de las proteínas antes de que estas alcancen el intestino para su absorción. En el lumen intestinal, las endopeptidasas pancreáticas, principalmente la tripsina, elastasa y quimotripsina junto con exopeptidasas como la carboxipeptidasa A y B, producen péptidos y aminoácidos libres. Los oligopéptidos producidos por acción de las enzimas gástricas y pancreáticas son hidrolizados por exo y endopeptidasas en la membrana intestinal de borde en cepillo de las células epiteliales, las cuales contienen al menos quince peptidasas que en conjunto tienen una amplia especificidad pudiendo degradar tanto proteínas como péptidos. Tras su administración oral, una proteína o péptido terapéutico debe resistir la acción de al menos 40 diferentes enzimas durante su paso por el intestino delgado. Además, las peptidasas lisosomales cuyo número se estima en más de 60, también representan una barrera para los péptidos y proteínas que son transportados a través de las células epiteliales. Los péptidos no digeridos y/o no absorbidos en el intestino delgado entran al intestino grueso o colón a través de la válvula ileocecal donde son metabolizados por la microbiota intestinal.

La base celular del transporte activo de nutrientes reside en las propiedades de las regiones luminal y contraluminal de la membrana plasmática celular. Las células del intestino delgado constituyen un ejemplo notable de la diferenciación y especialización de los dos tipos de membrana. Ambas difieren en aspectos fisiológicos, composición enzimática, química y funciones de transporte. La membrana luminal que está en contacto con los nutrientes del quimo está especializada en la digestión terminal así como la absorción de nutrientes a través de sistemas de transporte que llevan a cabo una absorción concentradora. Por el contrario la membrana

contraluminal, que está en contacto con el fluido intercelular, capilares y linfa, tiene propiedades similares a las de la membrana plásmatica de la mayoría de las células (Devlin, 2017). En general, existen dos vías posibles para el movimiento de los solutos a través de una barrera celular, como se muestra en el **Esquema 4.2**. En el caso del epitelio intestinal, la *vía paracelular* (C) es una vía acuosa que implica la difusión del soluto entre las células epiteliales adyacentes; esta difusión pasiva está restringida por la presencia de uniones estrechas que definen las características y propiedades de la permeabilidad; sólo pequeñas moléculas hidrofílicas son capaces de lograr un pasaje entre la unión de dos células, salvo que ocurra una modulación de las uniones celulares. La *vía transcelular* alternativa requiere el movimiento del soluto a través de la célula. Para que ocurra un proceso de este tipo, el soluto debe interactuar con algún componente de la membrana celular. En el caso de una célula epitelial polarizada, la membrana apical consiste en una matriz de proteínas asociadas periférica e integralmente dentro de una matriz lipídica organizada (Burton y col., 1996). Para algunos solutos, estas proteínas sirven como transportadores o receptores específicos para la absorción en la célula (B). Por su parte, el mecanismo transcelular mediado por endocitosis (D) es mínimo en el intestino de los adultos y no suele ser un mecanismo probable de absorción. Por último, para muchos solutos no existe un mecanismo específico y el transporte ocurre mediante difusión pasiva a través de la membrana apical, a través de la célula propiamente dicha y a través de la membrana basolateral, atravesando así la célula (A). La difusión pasiva es un proceso independiente de la energía caracterizado por el movimiento del soluto en respuesta a un gradiente químico. Además, el flujo será independiente de la dirección; es decir, la velocidad de difusión del soluto de apical a basolateral es la misma que en la otra dirección.



*Esquema 4.2. Rutas por las cuales un soluto puede cruzar una barrera celular. (A) Difusión pasiva transcelular a través de las membranas plasmáticas y el compartimento citoplasmático (B) captación mediada por portador y difusión pasiva; (C) difusión pasiva paracelular a través del espacio intercelular; (D) transcitosis mediada por receptores o adsorbente.*



Finalmente, la interacción del soluto con la célula para que el transporte tenga lugar estará influenciada por las características estructurales del soluto (Burton y col., 1996). Para que pueda ocurrir un flujo pasivo, la molécula debe tener las características fisicoquímicas adecuadas (tamaño, carga, lipofilicidad, potencial de unión al hidrógeno, conformación). Se ha observado que la contribución de la absorción paracelular pasiva en la de absorción de nutrientes (glucosa, aminoácidos) es baja en mamíferos y que la mayor parte de estos compuestos ingresan por la vía transcelular (Fasulo, 2014).

Muchos péptidos y aminoácidos se absorben a través del sistema de transporte peptídico transepitelial intestinal. De acuerdo con este modelo, el gradiente de protones transmembrana y la diferencia de potencial de membrana resultante proporcionan la fuerza impulsora para la captación de péptidos en las células epiteliales intestinales a través de transportadores de péptidos sobresalientes ubicados en las membranas apicales. Los péptidos que son resistentes a la hidrólisis por peptidasas intracelulares son transportados a través de la membrana basolateral a través de los transportadores basolaterales de péptidos. El intercambiador de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  genera y mantiene el gradiente interno de protones en la superficie luminal, mientras que la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa presente en la membrana basolateral mantiene una baja concentración de sodio intracelular. Debido a que los protones se cotransportan con péptidos a través de la membrana epitelial, este sistema también se conoce como el sistema de cotransporte péptido H-dependiente. Los transportadores de péptidos pueden aceptar di- y tri-péptidos como sustratos fisiológicos, lo que indica que tienen una especificidad de sustrato mucho más amplia que otros transportadores nutricionales. En consecuencia, los transportadores de péptidos reconocen compuestos extraños que se asemejan estructuralmente a péptidos pequeños y así funcionan no solo como transportadores nutricionales, sino también como transportadores de fármacos. Actualmente, los transportadores de péptidos se dividen en dos tipos: los localizados en las membranas del borde en cepillo de las células epiteliales y los localizados en las membranas basolaterales de las células epiteliales intestinales y renales. En este sentido, uno de los más importantes es el PEPT1 intestinal; un transportador localizado en el borde de cepillo (membrana apical) (Yihong y col., 2009).

Por otro lado, existe un *cotransporte o transporte activo secundario*, donde la energía necesaria para el pasaje proviene del cotransporte del sodio, es decir, los péptidos o aminoácidos libres se unen en la membrana de la microvellosidad con una proteína de transporte específica, la cual también requiere de la unión del sodio para que el transporte se pueda hacer efectivo. El ion sodio entra en la célula a favor del gradiente electroquímico, y entonces “arrastra” consigo al aminoácido o péptido.

Dado el gran interés que han generado en los últimos años péptidos grandes con potencial actividad biológica o terapéutica, el estudio de su biodisponibilidad y absorción es de gran importancia. La baja permeabilidad de los péptidos y proteínas a través de las membranas biológicas puede atribuirse a su estructura hidrofílica y tamaño molecular. Es fundamental la

estructura peptídica a la hora de evaluar el proceso de absorción de péptidos; se ha sugerido, por ejemplo, que un impedimento importante para la absorción pasiva de los péptidos es la energía requerida para romper los enlaces de hidrógeno de estos con el agua para que el soluto entre en la membrana celular. También son fundamentales la carga y la extensión de la cadena peptídica (Conradi y col., 1991).

Si bien algunas publicaciones afirman que el contenido de péptidos que logran llegar a la circulación intactos es menor al 1 % de los péptidos presentes en la luz intestinal y que la mayoría serían absorbidos como aminoácidos libres, di o tripéptidos (Gardner, 1984 y Pappenheimer y col., 1994), en los últimos años se han realizado numerosos estudios en los que se demuestra que péptidos de mayor longitud serían capaces de ser absorbidos de manera intacta. Por ejemplo, Aiello y col. (2018) estudiaron la absorción de péptidos de hasta 8 aminoácidos con efecto hipocolesterolémico encontrando que estos se absorbieron parcialmente pero también se hidrolizaron a fragmentos más cortos por acción de las peptidasas del borde de cepillo. Las diferentes rutas de transporte se pueden diferenciar usando inhibidores selectivos. Wang y Li (2017) estudiaron el efecto del peso molecular peptídico sobre el transporte transepitelial y la degradación por parte de peptidasas; demostraron que la ruta paracelular es la principal vía de transporte intestinal para péptidos de peso molecular entre 1600–500 Da y PepT1 es responsable principalmente del transporte de péptidos con pesos moleculares más bajos (< 500 Da, dipéptidos y tripéptidos). Los péptidos transportados por PepT1 mostraron una mayor biodisponibilidad que los péptidos transportados a través de la ruta paracelular, y además, los di- y tripéptidos con aminoácidos C-terminales cargados tuvieron una alta biodisponibilidad. Las peptidasas del borde en cepillo fueron responsables de la degradación de los péptidos en la ruta paracelular. Regazzo y col (2010) examinaron el transporte del péptido b-CN(193-209), un péptido largo e hidrófobo compuesto por 17 aminoácidos (masa molecular de 1881 Da) derivado de la  $\beta$ -Caseína. En este caso también utilizaron inhibidores selectivos de las diferentes rutas. Los resultados mostraron que el péptido resistió la acción de las peptidasas de la membrana del borde en cepillo y que se transportó efectivamente. La ruta principal involucrada en el transporte transepitelial del péptido b-CN(193–209) fue la transcitosis a través de vesículas internalizadas. Todos estos estudios se llevaron a cabo utilizando como modelo la línea celular Caco-2; sin embargo, existen otros modelos a la hora de evaluar la absorción de drogas y componentes bioactivos.

### **Modelos de estudio de la absorción intestinal**

Se han establecido una gran variedad de modelos basados en células y animales para el estudio de la absorción intestinal.

#### *Modelos animales in vivo*

Los modelos animales *in vivo* se usan ampliamente para predecir la absorción intestinal y el metabolismo de distintos compuestos. Después de administrar el compuesto vía oral o intraduodenal, se determinan los niveles plasmáticos de los compuestos en función del tiempo.

Ejemplos de modelos animales *in vivo* que se usan principalmente para predecir la absorción y el metabolismo de distintos compuestos son ratas, perros, monos y cerdos. Sobre la base de la similitud de la composición de las membranas celulares epiteliales de los mamíferos y el hecho de que la absorción es básicamente una interacción entre el compuesto y la membrana biológica, la permeabilidad en el tracto gastrointestinal debe ser similar en todas las especies (Antunes y col., 2011).

#### *Modelos ex-vivo*

- **Cámara de Ussing:** Este modelo se desarrolló originalmente para medir el transporte activo de NaCl en membranas epiteliales utilizando secciones de piel de rana (Ussing y Zerahan, 1950). En los ensayos, una sección del tejido intestinal abierto se ubica entre dos partes de una cámara, de modo que la membrana de la mucosa (lado apical) del intestino se enfrente a un lado de la cámara, mientras que la membrana serosa (lado basolateral) se enfrenta a la otra. Ambos lados de la cámara se llenan con un medio apropiado y se mantienen en las condiciones adecuadas para mantener la viabilidad del tejido (5 % de CO<sub>2</sub>, 95 % de O<sub>2</sub>, 37 °C). Al agregar el compuesto a analizar a un lado de la cámara se puede determinar el transporte al otro lado mediante el cálculo de la permeabilidad aparente ( $P_{app}$ ) (Kisser y col., 2017). Este modelo es ampliamente usado en la industria farmacológica ya que proporciona una buena predicción para la absorción intestinal de medicamentos, su interacción con los transportadores de entrada/salida y su metabolismo.
- **Saco intestinal invertido:** Los sacos invertidos se preparan a partir de intestino animal recién aislado. Los animales se anestesian con éter, se retira rápidamente el yeyuno, el duodeno o el íleon del intestino y se divide en segmentos. Después del aislamiento, los segmentos se enjuagan con soluciones de limpieza adecuadas y son evertidos suavemente sobre una varilla de vidrio. Posteriormente, se sujeta y se ata un extremo del intestino evertido y luego se llena con la solución adecuada. Se sella el segmento del intestino lleno con una segunda atadura y se transfiere el saco lleno al recipiente de incubación que contiene el compuesto en medio oxigenado a 37 °C durante el tiempo deseado, seguido de una medición de la concentración del compuesto dentro del saco (Alam y col., 2012). Se trata de un modelo rápido y económico, sensible y específico, aunque hay varios factores que afectan los resultados, por ejemplo, factores relacionados con el animal (edad, sexo, especie, dieta, etc.) y el segmento intestinal utilizado.
- **Modelos de perfusión *in situ*:** La perfusión *in situ* de pequeños segmentos intestinales de ratas es un modelo comúnmente utilizado para estudiar la absorción de distintos compuestos así como su metabolismo. En este modelo, una solución del compuesto se perfunde a través de un segmento intestinal aislado, y la diferencia en las concentraciones en el flujo de entrada y salida se utiliza para calcular la permeabilidad del compuesto, proporcionando excelentes correlaciones con los datos de absorción humana (Alqahtani y col., 2013).

Tanto los modelos *in vivo* como los modelos *ex vivo* tienen un uso muy amplio en la investigación farmacológica sobre la absorción y el metabolismo de distintos fármacos. En la investigación

centrada en componentes bioactivos derivados de alimentos, se utilizan más frecuentemente modelos *in vitro* celulares en los estudios relacionados con la absorción intestinal.

#### *Modelos in vitro*

Dado que los cultivos primarios de enterocitos no tienen la capacidad de formar monocapas polarizadas con superficies apicales y basolaterales específicas, se utilizan líneas celulares establecidas para evaluar la permeabilidad y la absorción de distintas sustancias. Los sistemas *in vitro* se llevan a cabo en condiciones estandarizadas y controladas. Su uso está de acuerdo con la iniciativa "Tres Rs" de uso animal y bienestar animal, ya que permite reemplazar el uso de animales con técnicas alternativas, reducir al mínimo el número de animales utilizados y refinar la forma en que se llevan a cabo los experimentos. Sin embargo, existen desventajas asociadas con las técnicas *in vitro* ya que no se toman en cuenta la influencia de todo el organismo, lo que podría dar lugar a resultados erróneos (Antunes y col., 2011).

- **Células Caco-2:** Se trata, probablemente de la línea celular más utilizada con este propósito. Como se mencionó en el Capítulo 3, estas células derivan de un adenocarcinoma de colon humano y son capaces de crecer para formar una monocapa polarizada mostrando características morfológicas y funcionales similares a las de los enterocitos (Alqahtani y col., 2013). Un ejemplo de esto es la presencia, durante su cultivo, de microvellosidades y distintas enzimas como hidrolasas, enzimas del citocromo P450, y enzimas de fase II como la glutatión S-transferasa (GST). Numerosos estudios también han demostrado que expresan muchos sistemas de transporte activo que se encuentran en los enterocitos, incluidos los sistemas de transporte mediados por portadores de glucosa, péptidos, aminoácidos, vitaminas y ácidos biliares, además de la proteína de transporte de colesterol, Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1). Las células Caco-2 también expresan varios transportadores de eflujo tal como la glicoproteína-P humana (P-gp). Debido a esta expresión endógena de diferentes proteínas de transporte, el modelo de células Caco-2 es una línea celular utilizada comúnmente para los mecanismos de transporte de distintos compuestos. Todas estas características hacen que haya una alta expectativa en cuanto a la correlación de la permeabilidad *in vitro* estudiada en monocapas de Caco-2 con lo que ocurre *in vivo* (Yamashita y col., 1997). Estas células son capaces de diferenciarse espontáneamente cuando son sembradas sobre membranas semipermeables, en las cuales forman una monocapa continua polarizada con un sistema de borde en cepillo bien definido en la superficie apical. Para estudios de transporte, las células Caco-2 deben cultivarse alrededor de 21 días para formar uniones estrechas y expresar una gran cantidad de transportadores de flujo de salida (de Angelis y Turco, 2011).

- **Caco 2-TC7:** Dado que la población de la línea celular Caco-2 es bastante heterogénea y altamente dependiente de las condiciones de cultivo, lo que puede llevar a propiedades de transporte y permeabilidad variables, se han aislado una gran variedad de clones; entre ellos, el clon TC7 que se obtuvo de un pasaje tardío de la línea Caco-2 parental. Solo se han observado pequeñas diferencias entre la línea celular parental y el clon TC7 en términos de transporte

paracelular y difusión pasiva. Un estudio en el que se compararon cuatro líneas celulares Caco-2 concluyó que el clon TC7 consiste en una población más homogénea, provocando menores variaciones entre los resultados de absorción y presentando un mejor desarrollo de las uniones entre células (Turco y col., 2011).

- **MDCK** (Mardin-Darby canine kidney): Se trata de células que derivan de la parte tubular distal del riñón de perro, se usan con mucha frecuencia como alternativa a las células Caco-2 para ensayos de permeabilidad y transporte ya que alcanzan el estado de confluencia en tiempos más cortos que la línea Caco-2. Crecen formando una monocapa polarizada con uniones estrechas bien establecidas. Una de las principales desventajas de este modelo es su origen canino (Alqahtani y col., 2013). Existe un modelo alternativo de células MDCK transfectadas con glicoproteína-P humana (P-gp) que poseen sobreexpresión de esta proteína (Yang y col., 2018).
- **HT-29**: Estas células derivadas de carcinoma humano se usan comúnmente como método de screening en una gran variedad de estudios. A diferencia de las células Caco-2, no se diferencian espontáneamente bajo condiciones normales de cultivo, sino que necesitan la adición de varias sustancias químicas al medio de cultivo; por lo tanto diferentes especies químicas pueden producir varios tipos celulares y mezclas de poblaciones celulares. Dada esta variabilidad en la diferenciación estas células no se utilizan muy comúnmente en el estudio de absorción de compuestos (Zweibaum, 1991).

Luego de estudiar la digestión gastrointestinal simulada de proteínas de leche, Picariello y col. (2015) concluyeron que es necesario incluir una fase de tratamiento con peptidasas del borde en cepillo en cualquier modelo de digestión gastrointestinal *in vitro*, para simular lo que ocurre *in vivo*. Las peptidasas intestinales contribuyen a hidrolizar los péptidos liberados por la digestión gastrointestinal generando un conjunto de (oligo)péptidos resistentes a futuros clivajes y aumentando notablemente el grado de hidrólisis. Según estos autores, aún se requiere mucha investigación para definir los parámetros operativos con verdadera importancia fisiológica, para imitar el intestino. En este sentido, se espera que el mucus intestinal también juegue un papel clave como barrera fisicoquímica capaz de retrasar (o impedir) la interacción de péptidos y peptidasas. Un nuevo campo de investigación es la "quimiosensibilidad intestinal", el cual se refiere a la capacidad potencial de los nutrientes para transducir información nutricional al resto del organismo estimulando receptores intestinales lo cual a su vez está relacionado de alguna manera con una posible hidrólisis incompleta mediada por la membrana del borde en cepillo.

## OBJETIVOS

### Objetivo general

Evaluar la absorción intestinal de fracciones peptídicas y péptidos sintéticos de amaranto derivados de la digestión gastrointestinal simulada a través del modelo celular Caco-2-TC7.

### Objetivos específicos

- Simular la absorción intestinal utilizando el sistema de monocapa de células Caco-2-TC7, evaluando el pasaje y/o modificación de péptidos mediante el análisis cromatográfico de las soluciones apicales y basolaterales.
- Correlacionar la potencial absorción intestinal con características de las fracciones y de los péptidos.
- Correlacionar la potencial absorción intestinal con las actividades antioxidantes previamente evaluadas y valorar los potenciales sitios de acción de las distintas fracciones y péptidos.

### 4.1 Muestras proteicas

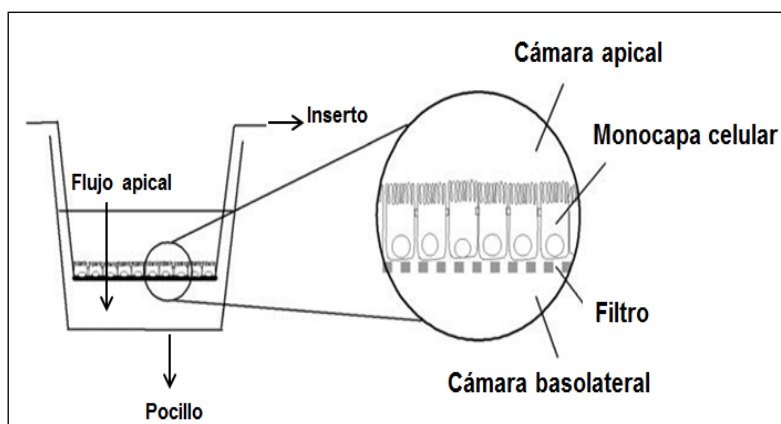
Las muestras seleccionadas para la evaluación de la absorción intestinal fueron:

- Digerido gastrointestinal simulado de aislado proteico (**Ad**)
- **Fracciones de Ad** obtenidas por cromatografía FPLC de filtración en gel: F8, F24, F28 y F34.
- **Péptidos sintéticos** generados por digestión gastrointestinal de A (P1 a P10).

### 4.2. Simulación de la absorción intestinal

#### 4.2.1. Monocapas de células Caco2-TC7 en insertos

Las metodologías de descongelación, tripsinado, recuento y cuantificación de las células así como los medios, buffers y soluciones utilizadas fueron los mismos que se detallaron en el Capítulo 3. Las células Caco-2 TC7 utilizadas para formar la monocapa celular correspondieron a los pasajes N° 39-40 del cultivo inicialmente adquirido en la ATCC. Para obtener monocapas celulares confluentes, las células Caco-2 TC7 provenientes de cultivos confluentes obtenidos en botellas de 75 cm<sup>2</sup> se tripsinaron y luego se sembraron en una concentración de 10<sup>5</sup> células/cm<sup>2</sup> en insertos de poliestireno con membrana filtrante de policarbonato (Millicell-PIHP 01250, Millipore) de 0,4 µm de tamaño de poro, 12 mm de diámetro y 0,6 cm<sup>2</sup> de área efectiva. Se incubaron en estufa de cultivo (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). En el **Esquema 4.3** se representa un inserto colocado sobre el pocillo de una placa; como se observa existen dos cámaras, la apical y la basolateral. En este caso, el estudio del flujo o transporte de los péptidos se realizó en la dirección apical-basolateral como se muestra en la figura. Además de la suspensión celular sembrada sobre la membrana, en la cámara basolateral se colocó medio de cultivo DMEM. El medio de cultivo de cada cámara se cambió cada 2 días, momento en el cuál se midió la resistencia transepitelial como se describe a continuación.



Esquema 4.3. Esquema de un inserto con formación de monocapa celular.

#### 4.2.2. Medición de la Resistencia Transepitelial (TEER)

La determinación de TEER ( $\text{ohmios.cm}^2$  ( $\Omega.\text{cm}^2$ )) es una técnica simple que proporciona información sobre la integridad de las uniones epiteliales cerradas y la confluencia de monocapas celulares cultivadas en soportes semipermeables. Se utiliza como un indicador de la “estrechez” de la unión entre las células, y está correlacionado con el transporte paracelular. Para la medida de la TEER se utilizó un voltímetro Millicell®-ERS equipado con dos electrodos (Millipore, USA) (**Esquema 4.4**). Estos electrodos se colocan en el medio de cultivo, uno en el compartimiento inferior (cámara basolateral) y otro en el superior (cámara apical), y la resistencia se determina directamente mediante un voltímetro alimentado por batería.



Esquema 4.4- Voltímetro Millicell ®-ERS

Antes de su uso los electrodos se esterilizaron sumergiéndolos en etanol 70 % v/v durante 20 min; y luego se estabilizaron al sumergirlos en medio de cultivo DMEM a temperatura ambiente, durante 10 min. En primer término se realizó la lectura en los pocillos blanco, es decir, aquellos en los que no se habían sembrado células. Luego, se midió la resistencia en todos los insertos con células. Por último, se calculó la TEER para cada uno de los insertos a partir del área del inserto ( $\pi \times \text{radio}^2$ ) de acuerdo a la *Ecuación 4.1*.

$$\text{TEER } (\Omega.\text{cm}^2) = (\text{Resistencia total} - \text{Resistencia blanco})(\Omega) \times \text{Área } (\text{cm}^2) \quad \text{Ecuación 4.1}$$

Se considera que la monocapa celular se encuentra correctamente formada cuando la TEER alcanza un valor constante (Artursson, 1990).

#### 4.2.3. Determinación de la actividad transportadora

La actividad transportadora de la monocapa celular fue determinada en dirección apical – basolateral. Una vez formada la monocapa (TEER constante), se retiró el medio de cada cámara, se adicionaron 0,5 mL de PBS en cada una y se incubó durante 20 min en estufa (37 °C, 5 % de  $\text{CO}_2$ ), para estabilizar los insertos. Transcurrida dicha incubación, el PBS de ambas cámaras fue removido, se sembraron 400  $\mu\text{L}$  de las muestras en la cámara apical, mientras que en la cámara basolateral, o receptora, se colocaron 400  $\mu\text{L}$  de PBS, y se incubó durante 3 h (37 °C, 5 % de



CO<sub>2</sub>) (Karlsson y Artursson, 1991). Luego de transcurrido dicho tiempo, se tomaron las muestras de ambas cámaras y se almacenaron a -20 °C hasta su análisis por RP-HPLC.

#### **4.2. Análisis por RP-HPLC.**

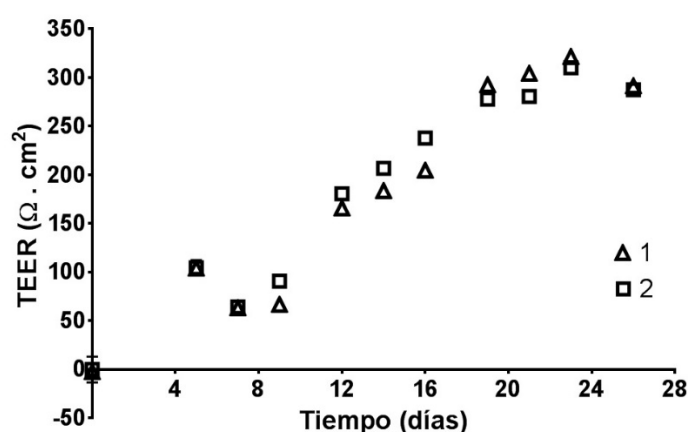
Tanto las muestras de la cámara apical y basolateral luego de la incubación, como cada una de las muestras originales fueron analizadas por RP-HPLC. Para ello, se utilizó una columna analítica Phenosphere Next C18 5 µm 4,6 x 250 mm (Waters), con un equipo HPLC Waters (Waters Corp., Milford, MA) equipado con un detector de arreglo de diodo (DAD). Para la corrida se utilizó una elución en gradiente utilizando dos solventes: el solvente A fue una mezcla de agua y acetonitrilo (98:2) con ácido trifluoroacético (TFA) (650 µL/L), mientras que el solvente B estuvo compuesto por una mezcla de agua y acetonitrilo (35:65) con TFA (650 µL/L). Las muestras (200 µL) fueron eluidas con un gradiente lineal del solvente B en A (0 a 100% en 55 min) a 40 °C, con un flujo de 1,1 mL/min (Orsini Delgado y col., 2016b)

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.3. Evaluación de la integridad de las monocapas mediante la resistencia eléctrica transepitelial (TEER)

Para evaluar si los péptidos son capaces de atravesar la monocapa celular de Caco-2 TC7 que simula la pared intestinal fue necesario que la monocapa se encuentre bien formada, sin discontinuidades y en confluencia. Como método de evaluación de la formación de la monocapa se realizaron medidas de la resistencia eléctrica transepitelial durante la evolución de las mismas. Una vez que dicho valor se mantiene constante, la monocapa se ha formado y se puede comenzar con el ensayo de medición de la actividad transportadora.

En la **Figura 4.1** se representa un ejemplo de medida de la TEER en función del tiempo de incubación. Se muestran medidas de TEER de monocapas crecidas en 2 insertos en los que se sembraron  $1 \times 10^5$  células Caco2-TC7/cm<sup>2</sup> el mismo día y a partir de un único tripsinado, todas incubadas y crecidas dentro de una misma placa. Puede observarse un aumento progresivo del valor de la TEER durante la incubación hasta alcanzar un valor máximo cercano a 300  $\Omega \cdot \text{cm}^2$ . Estos valores se alcanzaron luego de aproximadamente 20 días en distintos ensayos.



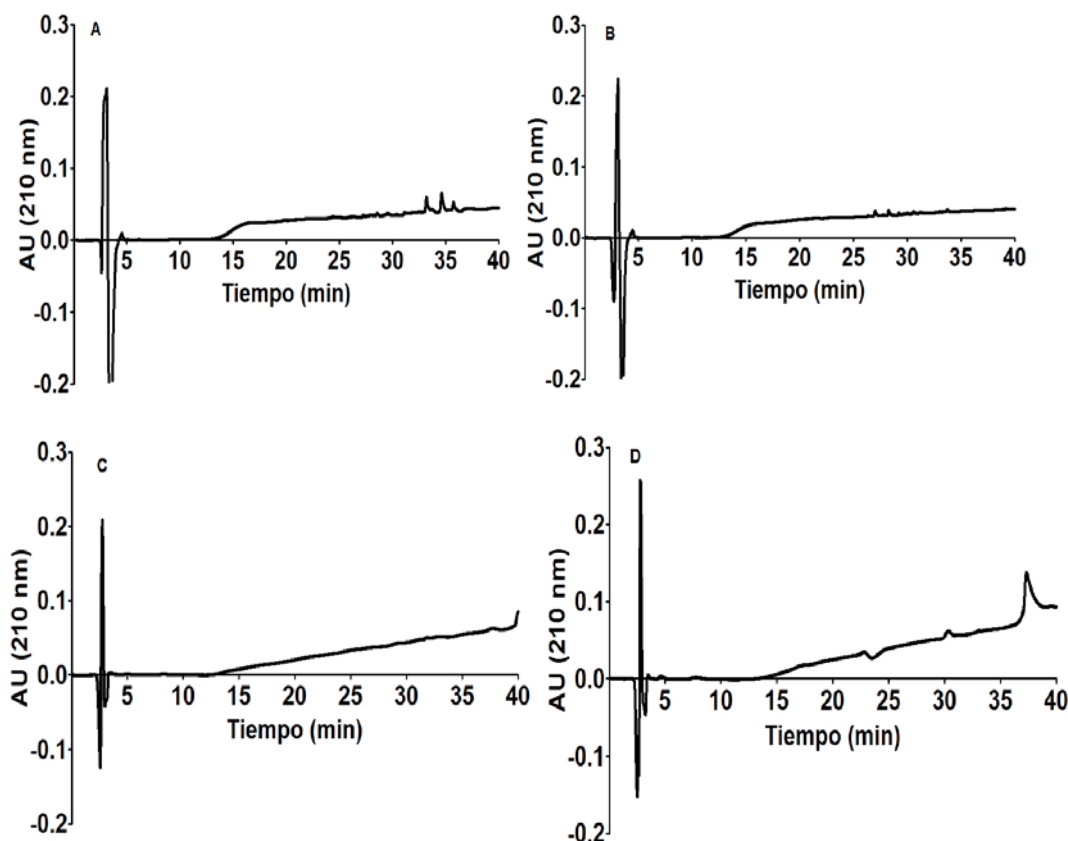
*Figura 4.1. Variación de la TEER durante la incubación de células Caco2-TC7 sobre insertos.*

Algunos autores consideran que la monocapa está íntegra cuando el valor de TEER está por encima de 200  $\Omega \cdot \text{cm}^2$  (Foltz y col., 2008). Luego de verificar la confluencia con la medida de TEER, se realizaron los ensayos de absorción, incubando las monocapas crecidas sobre los insertos con las muestras en estudio en la cámara apical. En la cámara basolateral se colocó el PBS y después de 3 h de incubación se tomó el contenido de cada una de las cámaras para su análisis junto con la muestra original correspondiente (Orsini Delgado y col., 2016b).

### 4.4. Simulación de la absorción intestinal de Ad

La evaluación de la absorción intestinal de las muestras en dirección apical se realizó a partir de los análisis de los cromatogramas correspondientes.

Dado que las muestras utilizadas se encontraban solubilizadas en buffer fosfato 35 mM se realizó el ensayo de absorción en presencia de este buffer (sin muestra). Luego se analizó, mediante RP-HPLC, el contenido de ambas cámaras, apical y basolateral. Los cromatogramas obtenidos se muestran en la **Figura 4.2.C** y **D**, respectivamente, en comparación con el buffer original (**Figura 4.2.A**). Dado que para los ensayos de absorción se colocó PBS en la cámara basolateral también se muestra el perfil correspondiente al buffer PBS original (**Figura 4.2.B**).

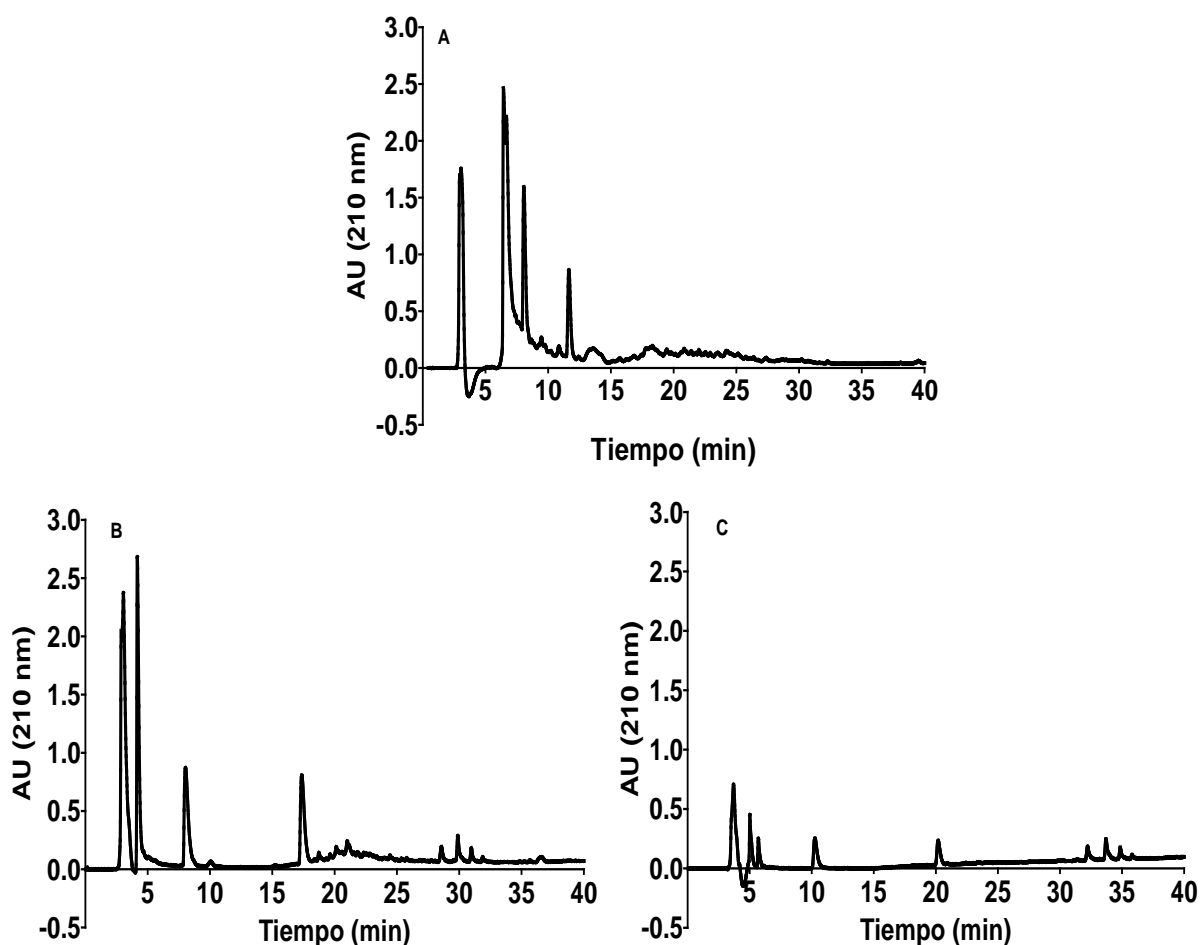


*Figura 4.2. Cromatogramas RP-HPLC correspondientes a: A: buffer 35 mM pH 7,8; B: PBS; C: Cámara apical del buffer 35 mM pH 7,8; D: Cámara basolateral del buffer 35 mM pH 7,8.*

Como se puede observar, los perfiles cromatográficos de los buffers son bastante similares, ambos presentan picos en la zona altamente hidrofílica del cromatograma: uno de alrededor de 0,2 de absorbancia a los 3 min y otro pico muy pequeño a los 5 min. Por otro lado, se observan unos picos muy pequeños entre los 30 y los 40 min, es decir en la región correspondiente a la elución de moléculas más hidrofóbicas. Al analizar el contenido de ambas cámaras para el caso del buffer muestra vemos que los 2 primeros picos se mantienen después del ensayo de absorción. Por otro lado, los otros picos no fueron detectados y apareció un pico a los 40 min en ambas cámaras. Es de esperar, por lo tanto, que todos estos picos aparezcan en los distintos perfiles cromatograficos que se analizaran a continuación. Este ensayo permite evaluar la posible liberación de moléculas por parte de la célula (no relacionadas con la muestra) a las cámaras que luego sean detectables en el cromatograma. En este sentido, se ha demostrado que monocapas

de células Caco2 crecidas sobre membranas semiporosas e incubadas (4-6 h) en presencia de metionina marcada radiactivamente, liberan moléculas proteicas tales como apolipoproteínas, transferrina y factor de crecimiento entre otras, preferencialmente en la cámara basolateral, sin necesidad de señales específicas (Rindler y Traber, 1988).

Se realizó la evaluación de la absorción de la fracción soluble completa de **Ad** a través de la monocapa celular. El ensayo se llevó a cabo sembrando una solución de **Ad** de concentración 1,16 mg/mL. En la **Figura 4.3** se muestran los cromatogramas obtenidos para la solución original de **Ad** y los contenidos de ambas cámaras.



*Figura 4.3. Perfiles RP-HPLC correspondientes al ensayo de absorción de Ad (1,16 mg/mL): A) Ad original; B) Cámara apical luego de 3 h de incubación; C) Cámara basolateral luego de 3 h de incubación.*

El perfil de **Ad** muestra 3 picos grandes y varios pequeños correspondientes a tiempos de retención ( $t_R$ ) entre 6 y 12 min (moléculas hidrofílicas), también se observan diversos picos de muy baja intensidad y tiempos mayores correspondientes a moléculas más hidrofóbicas. Al comparar este perfil con el de la fracción apical se observa que, si bien en esta última también aparecen tres picos principales, hay corrimientos en los  $t_R$  y desaparición de algunos picos pequeños intermedios en los mayores. Esto indica que hubo modificaciones en al menos algunos de los

componentes de **Ad** al estar en contacto con las células intestinales, que podrían estar relacionadas con la acción de las peptidasas del borde en cepillo. Por otro lado, en la cámara basolateral se repiten los mismos picos presentes en la apical pero en mucha menor intensidad. Esto indica que una proporción de las moléculas presentes en la cámara apical fueron capaces de atravesar la monocapa celular y alcanzar la cámara basolateral. Podría postularse que no ocurrieron modificaciones adicionales durante el pasaje dado los similares  $t_R$  en ambas cámaras, aunque esto no puede afirmarse sin una identificación de los péptidos presentes en cada caso. En términos generales y de acuerdo con estos ensayos podemos decir que ocurrió pasaje de moléculas con variabilidad en sus características de hidrofiliidad/hidrofobicidad.

#### 4.5. Simulación de la absorción intestinal de las fracciones de Ad

Se seleccionaron algunas fracciones de **Ad** obtenidas por cromatografía de exclusión molecular FPLC (Capítulo 1, sección 1.B) correspondientes a distintas zonas del cromatograma con el objetivo de evaluar su potenciales modificaciones y absorción al ser puestas en contacto con una monocapa de Caco-2 TC7.

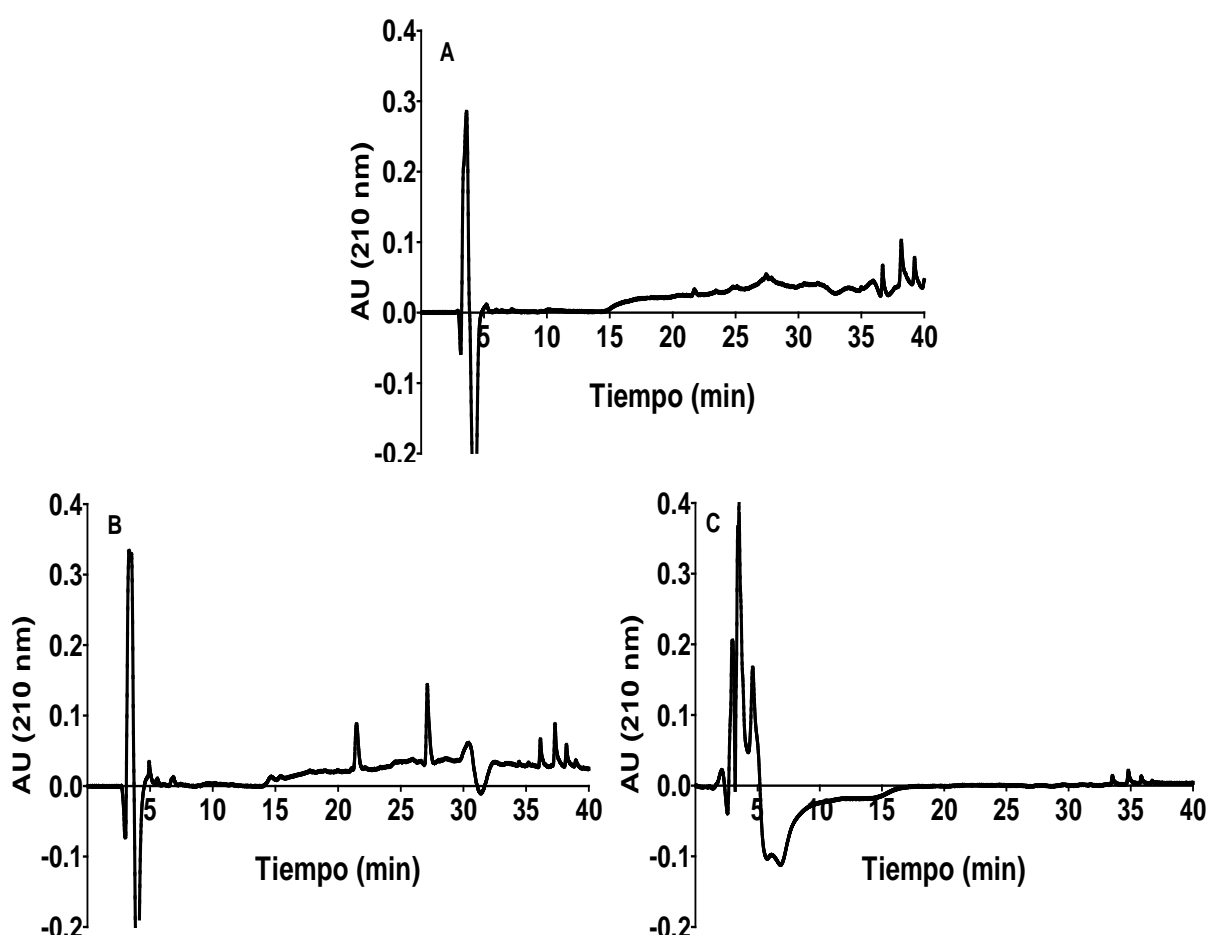


Figura 4.4. Perfiles RP-HPLC correspondientes al ensayo de absorción de F8: A) Fracción original B) Cámara apical; C) Cámara basolateral.

En la **Figura 4.4**, se muestran los perfiles de RP-HPLC correspondientes a la fracción F8 (7,4-8,4 kDa) original, el contenido apical y basolateral. La fracción original presentó, además de los picos correspondientes al buffer, un conjunto de picos no resueltos entre los 15 y los 36 min. En la cámara apical se observa la aparición de dos picos claramente definidos entre los 20 y 30 min y unos muy pequeños entre los 5 y 10 min, lo que indica modificaciones de las moléculas originales probablemente por medio de peptidasas extracelulares. En el perfil correspondiente a la cámara basolateral no se observan picos similares lo que sugiere que, en el tiempo de ensayo, estos péptidos no lograron atravesar la membrana. Esta fracción corresponde a una masa molecular de alrededor de 8 kDa, lo que implica polipéptidos con longitudes cercanas a los 70 aminoácidos (tomando como masa molecular promedio de los aa 110 kDa), que se bien los resultados indican degradación por peptidasas, podrían aún quedar moléculas grandes que presentan mucha mayor dificultad para ser absorbidas.

En la **Figura 4.5** se muestran los resultados de los experimentos de absorción analizados por RP-HPLC, las fracciones F24 y F28 de **Ad**. En cuanto a esta fracción F24 (0,97 – 1,1 kDa) vemos que en la fracción original hay un grupo de picos entre 8 y 15 min y otro grupo entre 20 y 40 min; estos picos no están claramente resueltos en el cromatograma. Al observar el perfil correspondiente a la cámara apical observamos que para  $t_R$  entre 15 y 30 min aparecen al menos tres picos claramente resueltos y otros menores, así como también otros picos pequeños a  $t_R < 10$  min; estos mismos picos aparecen en la cámara basolateral pero con menor intensidad. Estos resultados sugieren que las moléculas inicialmente presentes en la fracción sufrieron la acción de las peptidasas del borde en cepillo, una proporción de las moléculas resultantes correspondientes a  $t_R$  entre 20 y 40 min lograron atravesar la monocapa hacia el compartimento basolateral.

En cuanto a la fracción original de F28 (0,59 -0,66 kDa) puede observarse la presencia de varios picos: algunos con un  $t_R$  entre 5 y 8 min (moléculas mas hidrofílicas), un segundo pico a 12 min y un grupo de varios picos correspondientes a  $t_R$  entre 20 y 27 min. Al analizar el contenido apical todos estos picos también están presentes y lo mismo ocurre en la cámara basolateral pero con menor intensidad. Esto indica que en el caso de esta fracción, F28 (masas moleculares en el rango de 0,6 y 0,9 kDa, esto es entre 5 y 8 aminoácidos) no se registraron variaciones importantes en la cámara apical sugiriendo que los distintos componentes de esta fracción resistieron la acción de las peptidasas intestinales, y además, lograron atravesar la monocapa en una proporción considerable. Según sus  $t_R$ , estas moléculas se encuentran en un rango amplio de hidrofiliidad/hidrofobicidad.

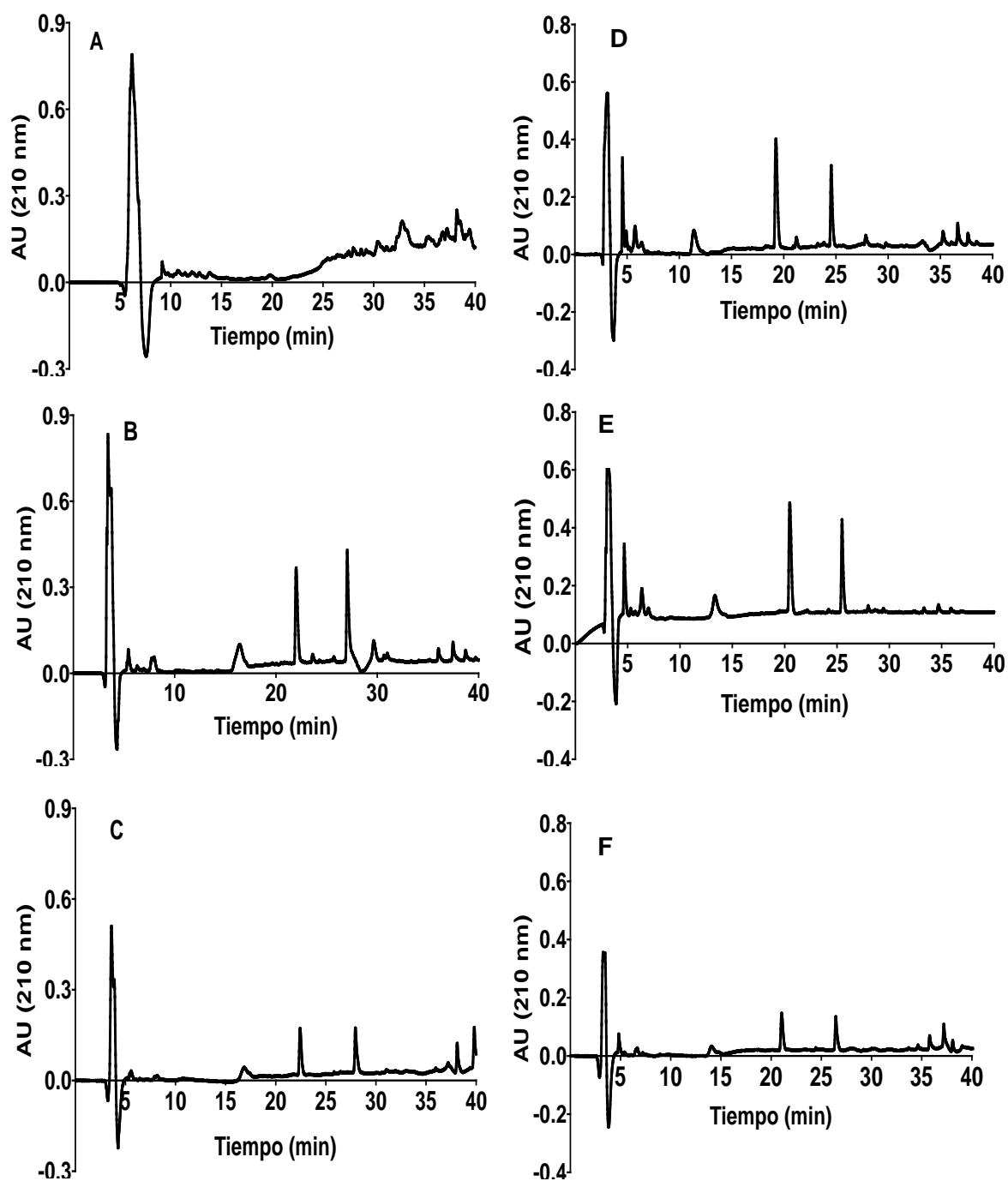


Figura 4.5. Perfiles cromatográficos de RP-HPLC correspondientes al ensayo de absorción de dos fracciones FPLC: A: F24 original; B: Cámara apical de F24; C: Cámara basolateral de F24; D: F28 original; E: Cámara apical de F28; F: Contenido basolateral de F28.

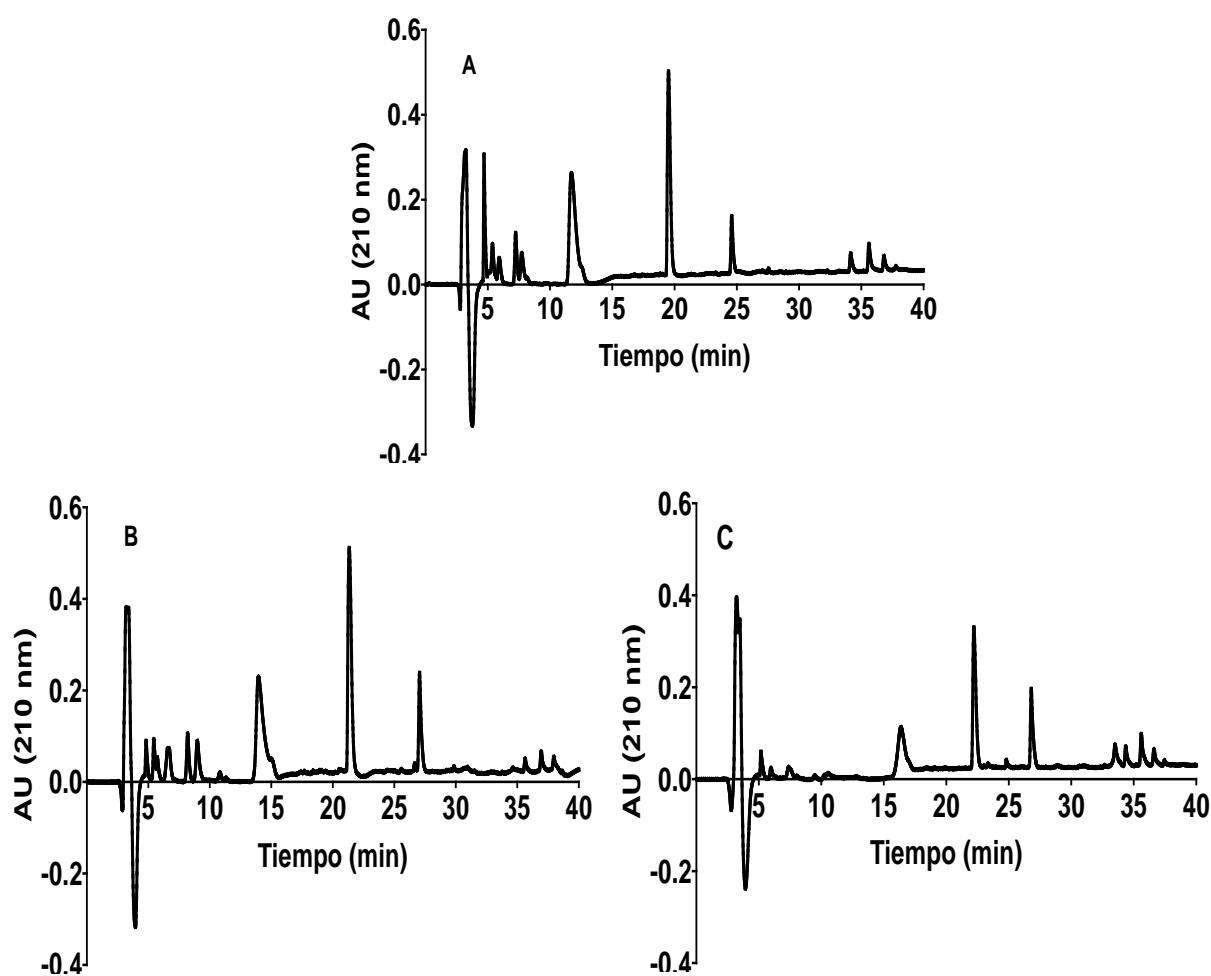


Figura 4.6. Perfiles cromatográficos de RP-HPLC correspondientes al ensayo de absorción de la fracción F34: A: F34 original, B: Cámara apical de F34; C: Cámara basolateral de F34.

En la **Figura 4.6** se muestran los perfiles correspondientes al ensayo de absorción de F34 (0,27 – 0,31 kDa), la cual corresponde a masas moleculares en el orden de di o tripéptidos. La fracción original presentó un perfil con similitudes respecto a F28 aunque con mayor presencia de moléculas hidrofílicas ( $t_R$  entre 5 y 10 min) y mayor intensidad del pico correspondiente a  $t_R = 12$  min, apareciendo también los picos a  $t_R$  cercano a 20 y 25 min. En este caso también los picos permanecieron en la cámara apical, disminuyendo solo parcialmente algún pico de bajo  $t_R$ . En la cámara basolateral se repite el perfil de la cámara apical pero con menor intensidad en todos los picos. Por lo tanto, esta fracción presentó un comportamiento similar al de F28, con resistencia de muchos de sus componentes a las peptidasas aunque el pasaje a través de la monocapa ocurrió en mayor proporción en este caso.

Xie y col., (2014) estudiaron la absorción de péptidos con actividad antioxidante derivados de la caseína. Los péptidos fueron obtenidos mediante hidrólisis con alcalasa. El hidrolizado fue separado por cromatografía de filtración en gel obteniéndose tres fracciones, dos con masas moleculares entre 1000 y 3000 Da, y otra con masa molecular por debajo de los 1000 Da. Finalmente, estas fracciones fueron sometidas a digestión gastrointestinal simulada y ensayos de



absorción celular a través de monocapas de células Caco-2. Después del ensayo de absorción (2 h) se identificaron varios péptidos pequeños (Ile-Glu, Ser-Asp-Lys y Ala-Tyr-Pro-Ser) capaces de atravesar la monocapa y mantener su actividad antioxidante. Por otro lado, en nuestro laboratorio, se han realizado algunos estudios previos del proceso de absorción de algunas fracciones separadas de un digerido de proteínas de *Amaranthus mantegazzianus* a través de la monocapa de Caco-2 TC7. Como en los casos aquí mostrados, se observó cambios por acción de peptidasas extracelulares y pasaje de algunos componentes (Orsini Delgado y col., 2016b).

#### 4.6. Simulación de la absorción intestinal de péptidos sintéticos

En el caso de los péptidos sintéticos el ensayo de absorción se realizó partiendo de soluciones en buffer fosfato 35 mM, pH 7,8 de cada péptido en una concentración de 1 mg/mL. Luego de realizado el ensayo de absorción se evaluaron los contenidos de las cámara apical y basolateral por RP-HPLC.

La **Figura 4.7** muestra los perfiles cromatográficos correspondientes a P1 y P2 (originales) y las cámaras apicales y basolaterales. En el caso de P1, observamos un pico principal a los 25 min y uno más pequeño a los 30 min (probablemente una impureza de la síntesis). Después del ensayo de absorción el pico mayoritario desaparece mientras que aparecen dos nuevos grupos de picos, uno entre los 17 y los 19 min y el otro entre los 20 y 25 min. En cuanto a la cámara basolateral vemos que aparecieron el pico correspondiente a  $t_R$  entre 20 y 25 min. En función de estos resultados, P1 fue hidrolizado por peptidasas del borde en cepillo y algunos de los péptidos resultantes fueron capaces de atravesar la monocapa.

En el caso de P2, observamos un pico a los 26 min y otro pequeño a los 28 min aproximadamente (también probablemente una impureza de la síntesis). En la cámara apical, similar a lo que ocurre con P1, vuelve a aparecer el pico principal y algunos más pequeños entre 23 y 25 min; en este caso sin embargo, no aparecen picos en la cámara basolateral, esto indica que hubo acción por parte de las péptidasas extracelulares sobre P2 y que ni el péptido original ni los productos de degradación fueron capaces de atravesar la monocapa de manera evidente para esta metodología.

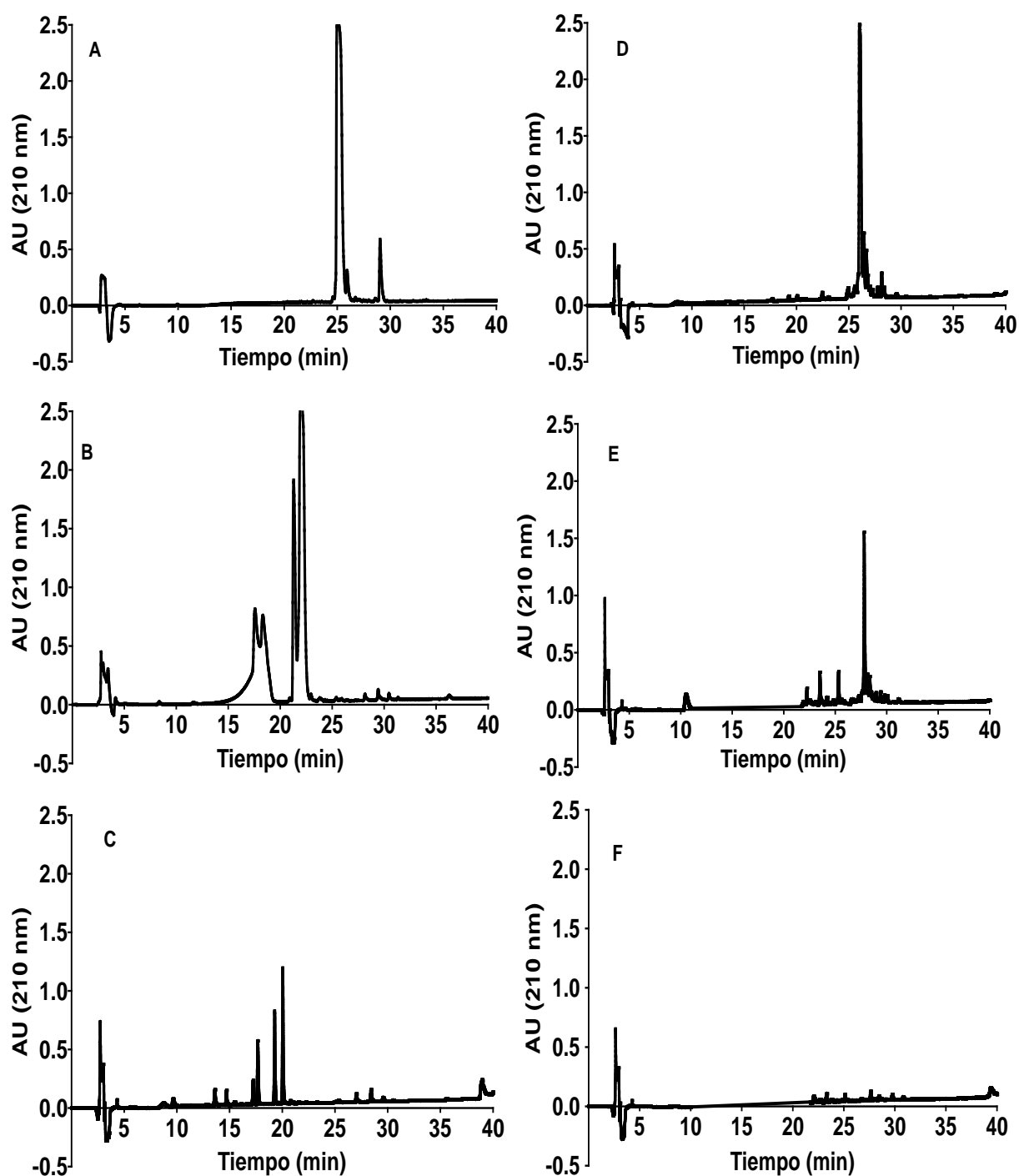


Figura 4.7. Perfiles RP-HPLC correspondientes al ensayo de absorción de dos péptidos: A) P1 original, B) Cámara apical de P1, C) Cámara basolateral de P1; D) P2 original, E) Cámara apical de P2, F) Cámara basolateral de P2.

En la **Figura 4.8** se muestran los perfiles correspondientes a P3 y P4. En cuanto a P3, la fracción original presentó un pico a los 15 min. Un pico de similar  $t_R$  aparece en la cámara apical junto a otros más pequeños (moléculas más hidrofílicas) a los 13 y 14 min. Por lo tanto, ocurrió una modificación al menos parcial por acción de peptidasas extracelulares. En la cámara basolateral

aparecen estos picos (original y productos de degradación) con menor intensidad, pero mostrando que una proporción importante fue capaz de atravesar la monocapa.

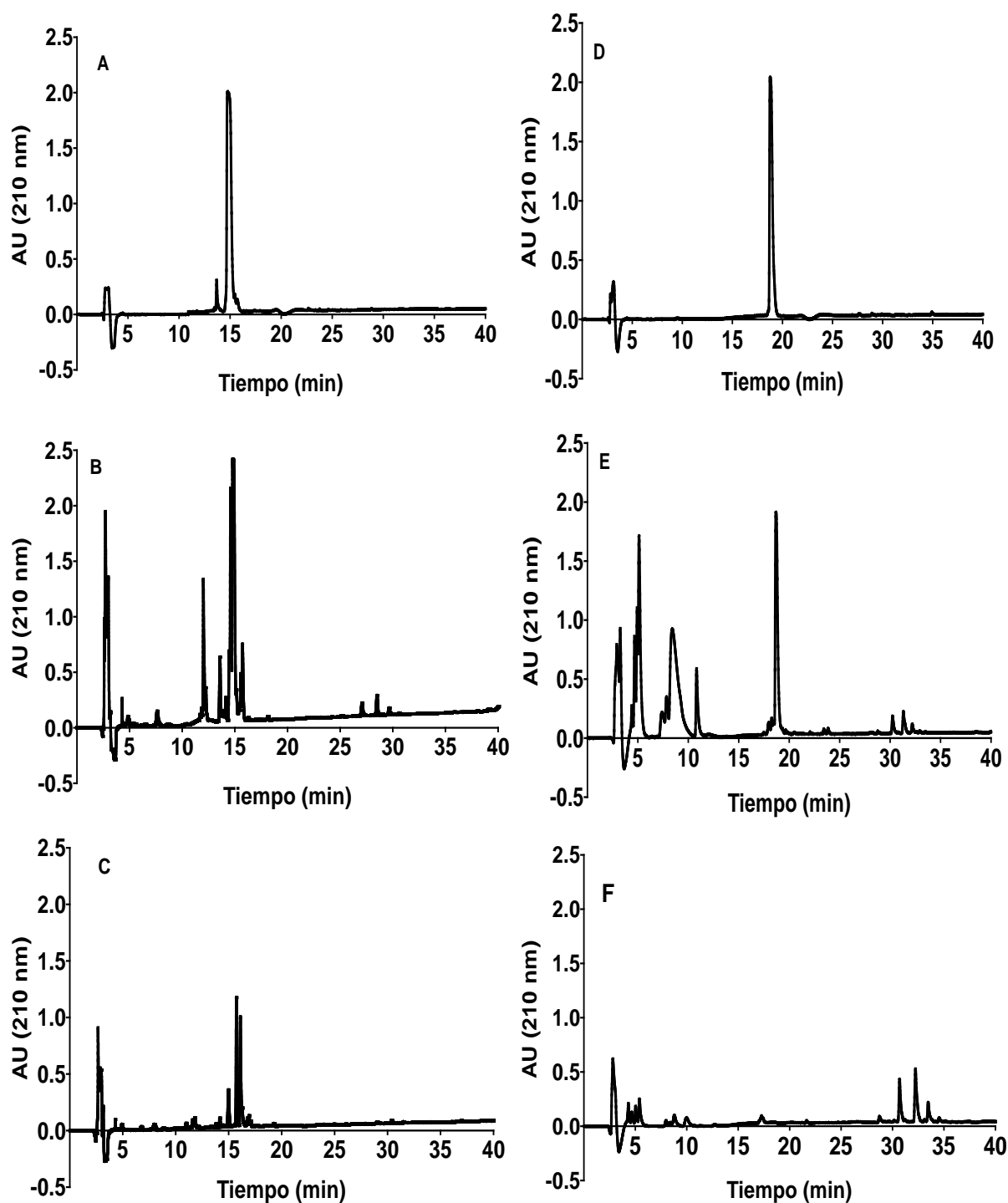


Figura 4.8. Perfiles cromatográficos de RP-HPLC correspondientes al ensayo de absorción de dos péptidos: A: P3 original, B: P3 apical, C: P3 basolateral; D: P4 original, E: P4 apical; F: P4 basolateral.

P4 presentó un único pico a los 19 min, el cual disminuyó su intensidad en la cámara apical apareciendo varios picos más hidrofílicos (entre 5 y 11 min) generados posiblemente por la acción

de las peptidasas del borde en cepillo. Estos últimos fueron los únicos que lograron atravesar la monocapa y aparecer en la cámara basolateral en una baja proporción.

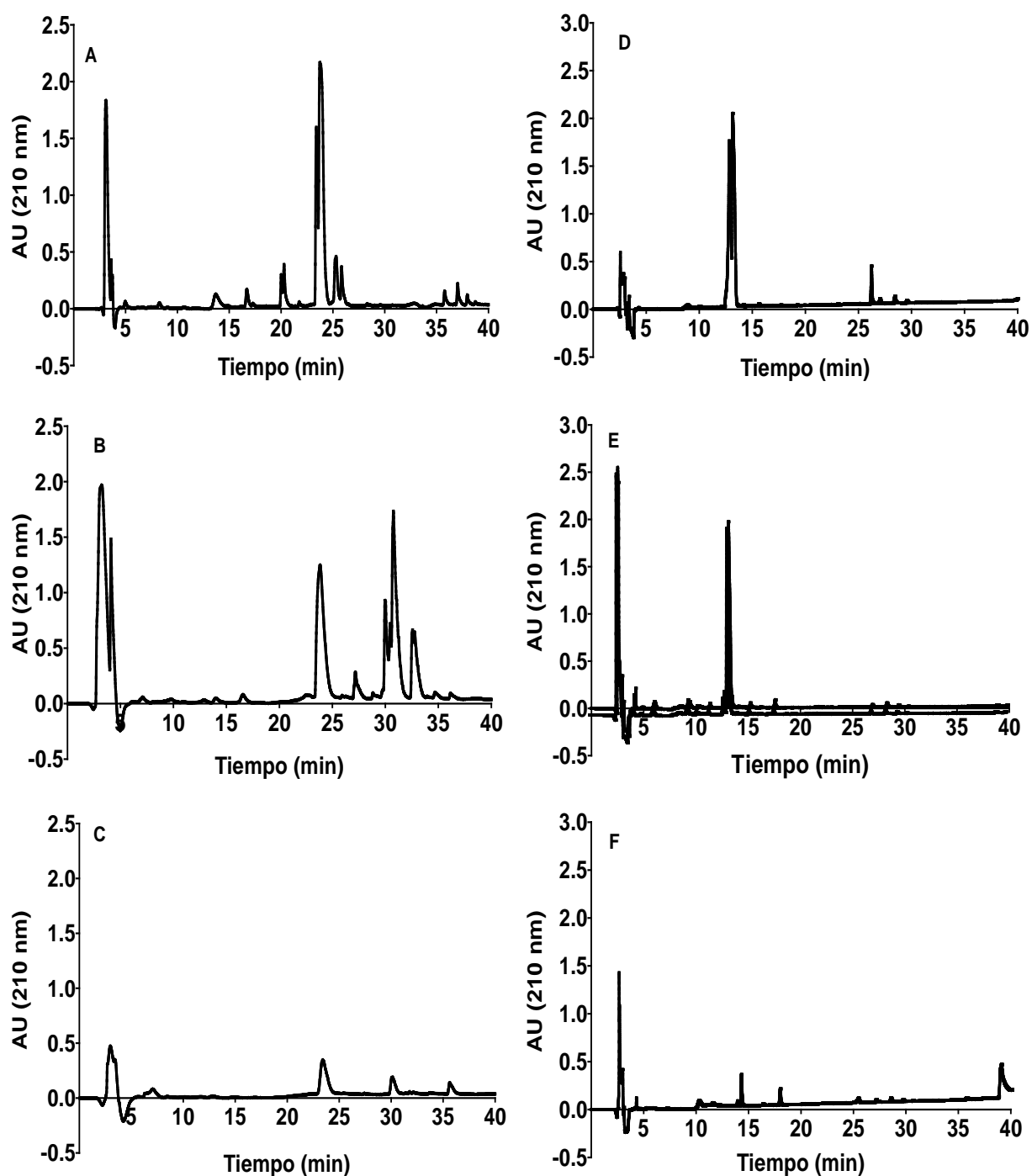


Figura 4.9. Perfiles RP-HPLC correspondientes al ensayo de absorción de dos péptidos sintéticos A: P5 original, B: P5 apical, C: P5 basolateral; D: P6 original, E: P6 apical; F: P6 basolateral

El perfil cromatográfico de P5 (**Figura 4.9.**) mostró un pico principal (alrededor de los 24 min) y otros picos menores más hidrófilos (14, 17 y 20 min) y uno más hidrofóbico (26 min) (todos estos podrían ser impurezas resultantes del proceso de síntesis). En la cámara apical prácticamente desaparecieron los picos más pequeños correspondientes a  $t_R$  entre 14, 17 y 20; el pico principal

disminuyó su intensidad mientras que se generaron varios picos más hidrofóbicos (27, 31 y 34 min), probablemente por la acción de las peptidasas. Tanto el péptido original como algunos de los productos de degradación más hidrofóbicos lograron atravesar la monocapa en proporción moderada.

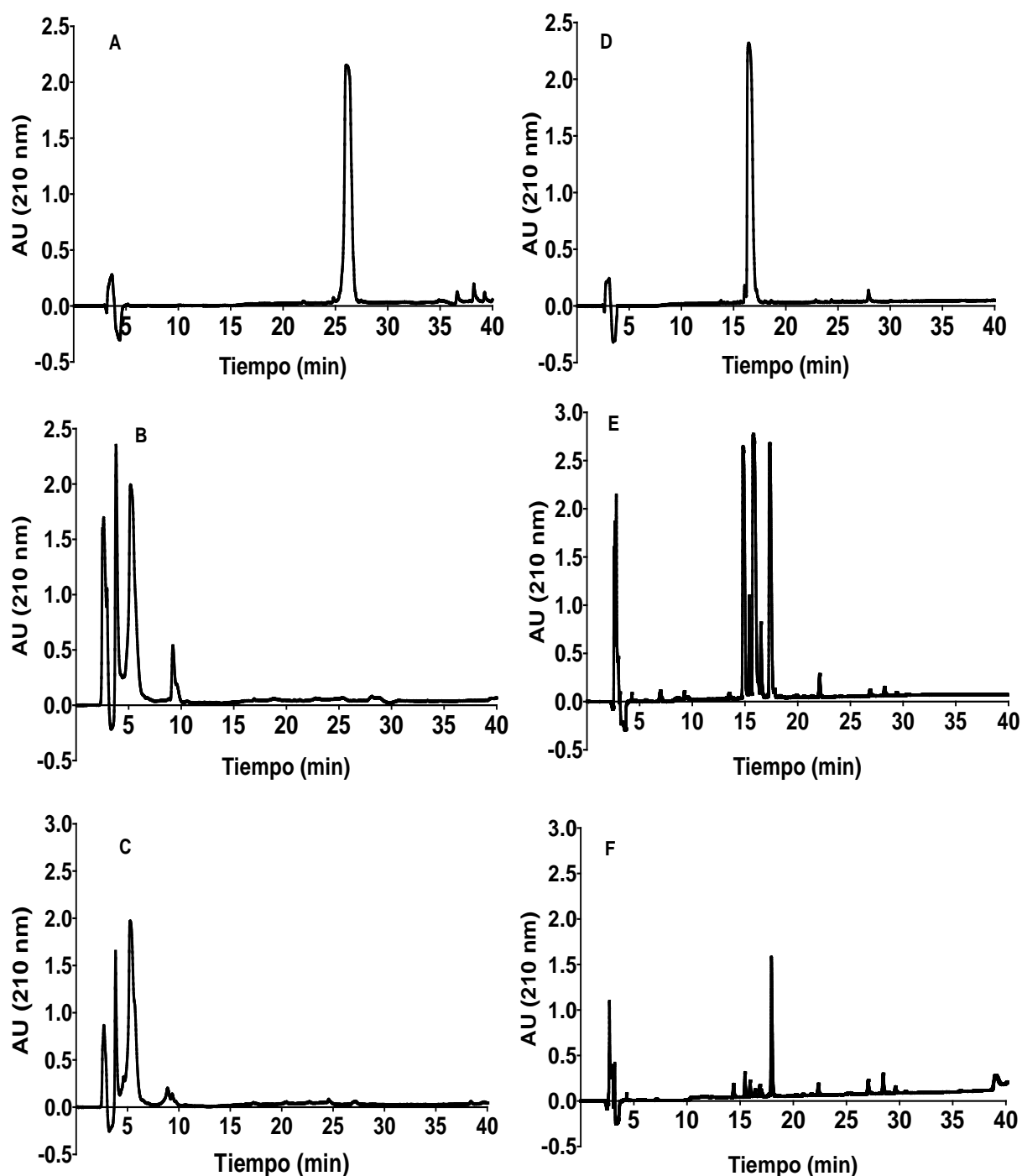


Figura 4.10. Perfiles cromatográficos de RP-HPLC correspondientes al ensayo de absorción de dos péptidos: A: P7 original, B: P7 apical, C: P7 basolateral; D: P8 original, E: P8 apical; F: P8 basolateral.

En el caso del perfil de P6 se ve un pico principal a los 12 min (bastante hidrofílico en comparación con los otros péptidos hasta ahora vistos); este pico también aparece en la cámara apical junto con uno muy pequeño a los 18 min. En la cámara basolateral aparecen estos dos picos, aunque el

primero en menor tamaño. Esto indica que el péptido y algunos de los productos de degradación por peptidasas lograron atravesar la monocapa celular en una proporción bastante baja.

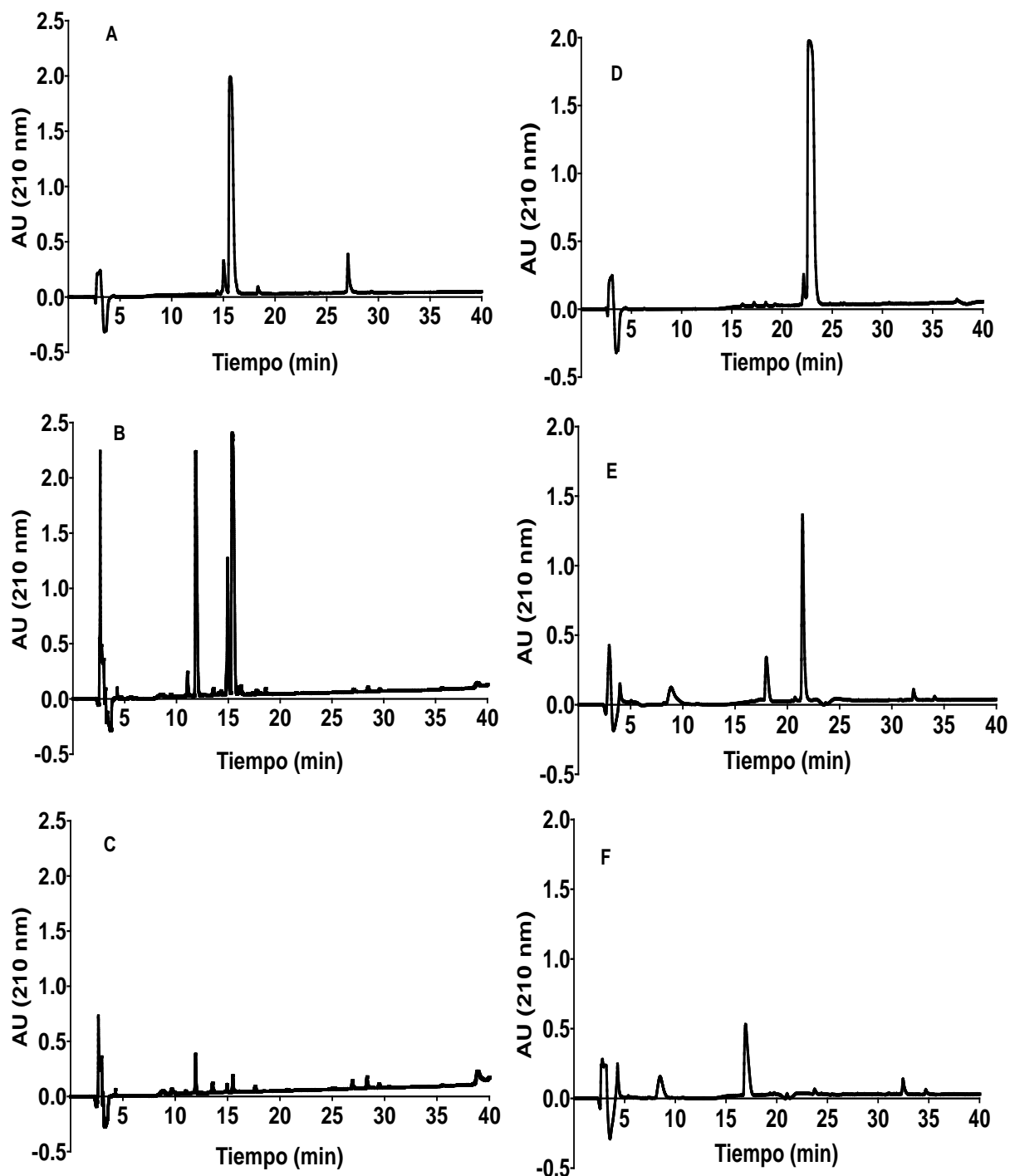


Figura 4.12. Perfiles cromatográficos de RP-HPLC correspondientes al ensayo de absorción de dos péptidos sintéticos A: P9 original, B: P9 apical, C: P9 basolateral, D: P10 original, E: P10 apical, F: P10 basolateral

Los perfiles cromatográficos obtenidos para P7 (**Figura 4.10**) muestran en la fracción original un pico a  $t_R = 26$  min. Al observar las cámaras apical y basolateral vemos que este pico desaparece completamente y es reemplazado por varios picos correspondientes a moléculas mucho más

hidrofílicas ( $t_R$  entre 3 y 9). Estos resultados indican que el péptido original fue completamente degradado por la acción de las peptidasas del borde en cepillo y que una alta proporción de los productos hidrofílicos generados lograron atravesar la monocapa.

El perfil de P8 muestra un pico principal a  $t_R = 17$  min. En la cámara apical se observa este pico y aparecen otros a tiempos algo menores. Todos ellos aparecen en la cámara basolateral, el original en mayor medida. Esto indica que la acción de las peptidasas generó moléculas más hidrofílicas y una proporción relativamente baja logró atravesar la monocapa, además el péptido original logró atravesar la monocapa en una buena proporción.

El perfil de P9 presentó un pico principal a los 16 minutos. En la cámara apical también aparece dicho pico pero acompañado de otro más hidrofílico (a los 12 min). Al analizar la cámara basolateral observamos que estos dos picos también están presentes aunque en menor tamaño. Estos perfiles sugieren que hubo un efecto de las peptidasas extracelulares sobre P9 originando moléculas más hidrofílicas de las cuales una porción pequeña logró atravesar la monocapa junto con el péptido original (también en baja proporción).

P10, por otro lado, presentó un pico principal a los 24 min. Este pico se observa en la cámara apical junto con nuevas moléculas (picos a 9 y 18 min) más hidrofílicas, posiblemente generadas por acción de las peptidasas del borde de cepillo. En la cámara basolateral no aparece el pico principal original mientras que aparece el pico más hidrofílico generado en la cámara apical. Esto indica que el péptido pudo haber sido degradado por las peptidasas a moléculas más hidrofílicas y estas fueron capaces de atravesar la monocapa celular.

Si analizamos en primer lugar el comportamiento cromatográfico de los 10 péptidos sintéticos originales, observamos que los  $t_R$  estuvieron en el rango de 12 a 26 min, correspondiente a una zona de hidrofobicidades intermedias en las corridas RP-HPLC. Comparando con las predicciones de hidrofiliidad/hidrofobicidad realizadas en el Capítulo 1 a través del parámetro GRAVY (ver **Tabla 1.10**), podemos observar que los péptidos que presentaron los mayores  $t_R$  (P2, P7) también registraron un índice GRAVY levemente hidrofóbico. El resto de los péptidos, con mayor carácter hidrofílico según GRAVY, presentaron menores  $t_R$  pero sin una correlación directa entre los dos parámetros, debido probablemente a otros factores que pueden influenciar el comportamiento cromatográfico como por ejemplo la masa molecular. En función de los resultados de los experimentos de absorción, puede remarcarse que se observaron diferentes comportamientos de los péptidos al encontrarse en contacto con la monocapa de células Caco-2 TC7 que simulaba la pared intestinal. En primer lugar, respecto al ataque por las peptidasas del borde en cepillo, se observaron tres comportamientos: degradación total, esto es desaparición total del péptido original y aparición de productos de hidrólisis (P1 y P7), degradación parcial en la que queda péptido original remanente y aparecen productos de la hidrólisis (P2, P3, P4, P5, P8, P9 y P10), y un caso en el que no parece haber modificaciones del péptido original (P6). En la mayoría de los casos, los productos de hidrólisis fueron más hidrofílicos que el péptido original (P1, P3, P4, P7, P8, P9 y P10) mientras que en el caso de P5 los productos fueron más hidrofóbicos. Respecto al pasaje a

través de la monocapa celular, pudo evidenciarse que en muchos de los casos hubo transporte hacia la cámara basolateral de algunos de los productos generados por la acción de las peptidasas (P1, P3, P4, P5, P7, P8 y P9). De los casos en los que hubo péptido original remanente, P3, P5, P8 y P9 lograron atravesar la monocapa en diferentes proporciones; también P6 (que no fue atacado por peptidasas) logró atravesar la monocapa celular. Cuando ocurre pasaje a través de la monocapa, podría darse un ataque por peptidasas citoplasmáticas (en casos de transporte transcelular). En ninguno de los ensayos realizados en este trabajo hay evidencias de esto, ya que siempre que apareció un pico en la cámara basolateral se encontró uno similar en la apical, pero no puede descartarse una modificación intracelular que genere una molécula con similar comportamiento cromatográfico que la original.

Cabe remarcar que estos resultados son descriptos solamente en base a los  $t_R$  de los picos, la aparición en dos cromatogramas de picos con  $t_R$  similar no asegura que correspondan a la/s misma/s especies, ya que podría tratarse de moléculas distintas con el mismo  $t_R$ . Para poder asegurar si existieron o no modificaciones, es necesario hacer una identificación de los péptidos presentes en cada caso por espectrometría MS/MS.

Diversos estudios sobre péptidos antioxidantes extraídos de fuentes alimentarias han incluido no solo experimentos para dilucidar sus características químicas, sino también la investigación de su biodisponibilidad y mecanismos intracelulares. Pappenheimer y col. (1994) sintetizaron octapéptidos con D-aminoácidos, de manera de evitar que los mismos fueran reconocidos por las peptidasas o por las proteínas de transporte, y observaron que cerca del 50 % de dichos péptidos fueron absorbidos intactos. Por otra parte, Regazzo y col. (2010) han demostrado que el fragmento  $\beta$ -caseína 193-209, que es un péptido largo e hidrofóbico (17 aminoácidos y 1881 Da) con actividad inmunomoduladora que surge de la hidrólisis de la  $\beta$ -caseína con pepsina, pudo ser absorbido, siendo su principal mecanismo de transporte la transcitosis. Dichos autores afirmaron que es muy probable que haya resistido la hidrólisis gracias al elevado contenido de restos de prolina en su estructura (Tyr-Gln-Glu-Pro-Val-Leu-Gly-Pro-Val-Arg-Gly-Pro-Phe-Pro-Ile-Ile-Val). Otros autores también han demostrado que péptidos con alto contenido de prolina lograron resistir la hidrólisis (Mizuno y col., 2004; Savoie y col., 2005). Por otra parte, Vermeirssen y col. (2002) informaron que, aunque en bajas concentraciones, el péptido lactokinina (Ala-Leu-Pro-Met-His-Iso-Arg) fue absorbido intacto. Quiros y col. (2008) demostraron que el pentapéptido antihipertensivo, His-Leu-Pro-Leu-Pro, proveniente también de la  $\beta$ -caseína, es capaz de ser absorbido y permanecer intacto; en este caso la ruta paracelular parecería ser la vía de absorción. Por lo tanto, existen diversas evidencias experimentales que demuestran que péptidos de más de 3 aminoácidos podrían ser absorbidos de manera intacta a través del epitelio intestinal, dependiendo de diversos factores como la masa molecular, la hidrofobicidad, la carga neta o la tendencia a agregarse (Fei y col., 1994; Aito-Inove y col., 2007). Xu y col. (2017) estudiaron la absorción de un péptido derivado de la proteína de colza, YWDHNNPQIR (denominado RAP) utilizando como modelo monocapas de células Caco-2. Los resultados mostraron que un



porcentaje de este péptido logró atravesar la monocapa intacto mientras que se encontraron tres fragmentos principales (WDHNNPQIR, DHNNPQIR y YWDHNNPQ) y cinco péptidos modificados derivados de RAP tanto en el lado apical como en el basolateral. En este trabajo, los péptidos que contienen prolinas fueron parcial (P5 y P9) o totalmente degradados (P7) por peptidasas extracelulares. El péptido que mostró mayor resistencia a la hidrólisis por las peptidasas (P6) tiene la secuencia LQAEQDDR (Leu-Gln-Ala-Glu-Gln-Asp-Asp-Arg), que tiene en común la presencia de un resto Arg en el extremo C-terminal con otros previamente informados (Vermeirssen y col., 2002; Xu y col., 2007), aunque no disponemos de información acerca de la relevancia que este hecho pueda tener en la resistencia frente a las peptidasas del borde en cepillo.

## CONCLUSIONES

*Los productos de digestión gastrointestinal simulada de aislado proteico de amaranto sufren modificaciones adicionales al enfrentarse a una monocapa de células Caco-2 TC7 que simula la pared intestinal. Estas modificaciones son parciales en la mayoría de los casos, o sea que permanece/n la/s molécula/s original/es en cierta proporción. Además, en algunos casos, fue posible verificar absorción de los componentes originales: fracciones F28 (alrededor de 0,6 kDa) y F34 (alrededor de 0,3 kDa), P3, P5, P8 y P9.*

*Los péptidos que presentaron mayores efectos en la prevención de la oxidación de las LDL inducida por  $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$  fueron P7, P3 y P10 (Capítulo 2). P7 mostró ser completamente degradado por las peptidasas del borde en cepillo; P10 fue degradado parcialmente por las peptidasas a moléculas más hidrofílicas y estas fueron capaces de atravesar la monocapa celular pero no la molécula original; en el caso de P3 fue parcialmente degradado, y tanto los productos generados como el péptido remanente pudieron atravesar la monocapa. Los otros péptidos que demostraron poder atravesar la pared sin modificaciones previas fueron P6 y P9, los cuales tuvieron una actividad moderada frente a la oxidación de las LDL (disminución de la velocidad de propagación) y P5 y P8 con actividades aún menos importantes. En función de esto, P3 se presenta como el mejor potencial candidato para poder ejercer un efecto frente a la oxidación de las LDL. Por otra parte, fracciones como la F28 separada a partir de Ad también presentó una interesante actividad frente a la oxidación de las LDL y mostró ser resistente a la modificación por peptidasas y ser absorbida en proporción importante, por lo que también resulta una potencial candidata para este tipo de acción biológica.*

*Las muestras que permanecieron al menos parcialmente sin degradarse por peptidasas extracelulares (F28, F34, P2, P3, P4, P5, P6, P8, P9 y P10), al estar presentes en la luz intestinal podrían colaborar con el mantenimiento del balance redox de las células de la mucosa intestinal:*

- Los péptidos con alta capacidad ORAC podría ejercer un efecto directo de neutralización de ROS en la luz intestinal, F28, F34, P8, P5, P2 y P1 serían los más activos (Capítulo 1).*
- Todas las fracciones y péptidos mencionados al comienzo de este párrafo, excepto P8 y P9, presentaron un efecto en la disminución de ROS intracelulares, y algunos otros efectos relacionados con el estado antioxidante de la célula (Capítulo 3), los cuales podrían estar desencadenados por la presencia del péptido en el interior celular o por la activación de alguna señal por interacción con la membrana plasmática.*
- P2 fue el único que no presentó ningún grado de absorción, ni la molécula original ni alguno de sus productos de hidrólisis. Sin embargo, este péptido había mostrado actividad frente a las ROS intracelulares. Estos hechos plantean dos posibles explicaciones: 1) P2 ingresa a la célula y en el interior celular es completamente degradado por lo que no aparece en la cámara basolateral; 2)*

*P2 no ingresa a la célula pero interacciona con la membrana plasmática y desencadena algún mecanismo de reducción de ROS.*

*Quedan por realizar a futuro estudios de los posibles mecanismos de absorción (e ingreso si corresponde) de estos péptidos a las células intestinales.*

*Para todas las fracciones y péptidos que generan otros productos por acción de las peptidasas del borde en cepillo, se abre el interrogante acerca de la actividad de las nuevas moléculas, tanto a nivel de la mucosa intestinal como a nivel sistémico para aquellas que logran ser absorbidas. Quedan por realizar a futuro estudios para la identificación y la evaluación de la actividad de los péptidos resultantes de la hidrólisis con las peptidasas.*

## **PARTE II. ESTUDIOS *IN VIVO***

**CAPÍTULO 5**

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA  
INCORPORACIÓN DE AISLADO DE AMARANTO  
EN LA DIETA DE RATAS WISTAR.**

## INTRODUCCIÓN

La capacidad antioxidante *in vivo* de un compuesto está determinada por factores tales como su biodisponibilidad y metabolismo, ya que una vez ingeridos pueden sufrir distintas biotransformaciones. Luego de los procesos de digestión gastrointestinal, los antioxidantes deben ser absorbidos, transportados, distribuidos y retenidos adecuadamente en los fluidos biológicos, células y tejidos donde ejercerán su acción. La biodisponibilidad de los antioxidantes y el efecto de la dosificación y la duración de su ingesta y de los metabolitos asociados son objeto de estudio en fluidos biológicos y tejidos de humanos y animales de experimentación. Esto lleva a que, en el caso de algunos componentes alimentarios potencialmente funcionales, se observe una actividad *in vitro* muy distinta a lo que ocurre realmente *in vivo* (Niki, 2010). Así, se introduce la necesidad de evaluar la capacidad de los antioxidantes mediante ensayos *in vivo* que puedan dar una mayor aproximación al verdadero efecto de estos compuestos activos. La capacidad y eficacia de los antioxidantes *in vivo* se puede evaluar por su efecto sobre el nivel de oxidación en fluidos (plasma, eritrocitos, orina, fluido cerebroespinal) y tejidos biológicos. Para este propósito se utiliza una gran variedad de biomarcadores del estrés oxidativo *in vivo*.

### **Ratas Wistar como modelo animal**

Se puede definir un modelo animal como un organismo vivo en el que se puede estudiar la biología o el comportamiento normativo, o en el que se puede investigar un proceso patológico espontáneo o inducido, y en el que el fenómeno en uno o más aspectos se asemeja al mismo fenómeno en humanos u otras especies de animales. En el estudio de patologías o procesos fisiológicos o de cualquier otro tipo asociados a humanos, el foco de la investigación es la analogía del comportamiento fisiológico del animal con nuestra especie. La importancia y la validez con respecto a la utilidad en términos de "extrapolabilidad" de los resultados generados dependen de la selección de un modelo animal adecuado. Un buen conocimiento de anatomía y fisiología comparada es una ventaja importante cuando se desarrolla un modelo animal. Los modelos animales se pueden encontrar en todo el reino animal, y el conocimiento sobre la fisiología humana se ha logrado en especies muy alejadas del humano en términos de desarrollo evolutivo. Los modelos animales se utilizan en la actualidad en prácticamente todos los campos de la investigación científica. Los estudios en el modelo animal exigen el control estricto de algunas variables que permiten conseguir resultados reproducibles. Estas variables a menudo son la edad, el sexo y el peso corporal, con lo cual, se caracteriza a los grupos de trabajo y se garantiza una posible extrapolación de los resultados al modelo humano (Hau y col., 2005).

Las ratas se han utilizado en la investigación científica desde el siglo XVII. Sin embargo, el desarrollo como modelo de investigación comenzó en 1906 cuando el Instituto Wistar desarrolló el modelo de rata Wistar (la cepa albina de *Rattus norvegicus*), para investigación biológica y médica. Hoy en día, esta es reconocida como el modelo de preferencia para la investigación en

diversas áreas, incluidas las enfermedades cardiovasculares, los trastornos neurológicos, los estudios neuroconductuales, la susceptibilidad al cáncer, la enfermedad renal, características biomédicas y toxicológicas así como nutricionales. Las ratas Wistar son apreciadas por muchas cualidades, un gran número puede criarse en poco tiempo con el mínimo gasto y con facilidad de reproducción dentro del laboratorio en condiciones adecuadas (Cossio-Bolaños y col., 2013; Sengupta, 2011).

### **Inducción del estrés oxidativo en modelos animales**

El estudio de las consecuencias biológicas del estrés oxidativo en modelos animales se puede dividir en dos enfoques o categorías: estudios endógenos o estudios exógenos. En los primeros, se usan modelos animales diseñados genéticamente que a través de procesos metabólicos normales producen un ambiente prooxidativo dentro de la célula o tejido y provocan una situación patológica como resultado. Esto arroja luz directamente sobre los potenciales objetivos y consecuencias celulares que pueden surgir debido a la generación de ROS *in vivo*; el uso de estos modelos está más relacionado con la patología específica que se desea modelar o estudiar. Por otra parte, se llevan a cabo estudios con modelos animales utilizando sustancias administradas exógenamente, capaces de generar radicales libres e inducir estrés oxidativo para luego caracterizar la respuesta del modelo animal o el efecto de algún antioxidante (Melov, 2002). En este sentido existe una gran diversidad de modelos de inducción del estrés oxidativo *in vivo*.

- **Modelo tratado con 6-OHDA**

La 6-hidroxidopamina neurotóxica (6-OHDA) se ha utilizado para generar modelos animales útiles en el estudio de la enfermedad de Parkinson ya que su administración produce la degeneración de las neuronas dopaminérgicas. Esta neurotoxina reproduce algunos síntomas de la enfermedad mediante la generación de estrés oxidativo (Hernandez-Baltazar y col., 2017), lo cual ocurre debido al metabolismo oxidativo de la dopamina que tiene el potencial de generar radicales libres citotóxicos y también por reacciones entre la 6-OHDA y el oxígeno que generan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y radical hidroxilo. En estos sistemas también se generan productos no radicales, como el MDA (Tanaka, y col., 2006). Muchos compuestos derivados de la dieta, en su mayoría fenólicos, con capacidad para combatir el estrés oxidativo han sido estudiados como agentes potenciales para el tratamiento contra el Parkinson en modelos tratados con 6-OHDA (Zbarsky y col., 2005).

- **Modelo tratado con alloxan y STZ**

El alloxan y la estreptozotocina (STZ) son análogos tóxicos de glucosa que se acumulan principalmente en las células  $\beta$  pancreáticas. El alloxan se ha utilizado ampliamente en modelos experimentales de *diabetes mellitus* insulín dependiente. En presencia de tioles intracelulares, especialmente glutatión, el alloxan genera ROS en una reacción redox cíclica produciendo ácido dialúrico. La autooxidación del ácido dialúrico genera radicales superóxido, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo que son finalmente los responsables de la muerte de las células  $\beta$  y el consiguiente estado de 'diabetes alloxan' dependiente de la insulina. La estreptozotocina (STZ) se

usa para inducir *diabetes mellitus* dependiente de insulina y no dependiente de insulina (Szkudelski, 2001). Su efecto se puede atribuir a su capacidad de alquilación, a su potencial para actuar como donante de óxido nítrico (NO) intracelular y, en menor medida, a la generación de ROS (Lenzen, 2008). Se ha estudiado el efecto en el tratamiento de la diabetes de extractos de plantas y varios tipos de té que son fuente de agentes antidiabéticos, antihiperlipidémicos y antioxidantes como aminoácidos, flavonoides y otros polifenoles, en modelos tratados con alloxan y STZ (Ashok Kumar y col., 2012; Sharifzadeh y col., 2017).

- *Modelo tratado con t-BHP*

El tert-butilhidroperóxido (t-BHP) se puede metabolizar a intermediarios de radicales libres mediante el citocromo P450 (en hepatocitos) o hemoglobina (en eritrocitos), que posteriormente pueden iniciar la peroxidación lipídica, afectar la integridad celular y formar enlaces covalentes con moléculas celulares, resultando en daño celular. Por esto, se ha utilizado ampliamente para inducir estrés oxidativo en animales principalmente en estudios de componentes polifenólicos de plantas superiores que pueden actuar como antioxidantes o a través de otros mecanismos que contribuyen a acciones anticarcinogénicas o cardioprotectoras (Wang y col., 2000).

- *Modelo inducido por etanol*

El etanol es uno de los factores exógenos más agresivo que, a través de la producción de ROS, puede generar estrés oxidativo y daño en tejidos como el intestino (Takayama y col., 2016) y el hígado (Comporti y col., 2010). Se han usado varios métodos diferentes para la inducción del estrés oxidativo por etanol, sin embargo, actualmente no hay consenso sobre la modulación de las enzimas antioxidantes en el daño de ROS inducido por etanol (Zhang y col., 2017).

- *Modelo tratado con D-galactosa*

El azúcar reductor D-galactosa puede reaccionar fácilmente con las aminas libres de aminoácidos y péptidos para formar productos finales de glicosilación avanzada. La inyección de D-galactosa en roedores induce cambios que se asemejan al envejecimiento acelerado (Parameshwaran y col., 2010). El mecanismo por el cual esto ocurre puede implicar la formación de galactitol por reducción de galactosa durante el metabolismo celular; este galactitol se acumula en la célula y causa estrés osmótico lo que da como resultado estrés oxidativo (Zhang y col., 2017). Se usa principalmente en modelos de envejecimiento y los órganos más afectados son el cerebro y el hígado (Ramana y col., 2006).

- *Modelo hiperlipidémico*

Las ingesta de dietas con alto contenido de grasa (HFD) se asocia con estrés oxidativo, obesidad y el síndrome metabólico relacionado que implica una gran variedad de procesos inflamatorios y que se caracteriza por un aumento de los factores de riesgo cardiovascular como la hipertensión, la dislipidemia (aumento de triglicéridos y colesterol asociado a LDL) y la intolerancia a la glucosa (Vargas-Robles y col., 2015). Por todo esto, muchos estudios han utilizado los modelos hiperlipidémicos inducidos por HFD para la evaluación del estrés oxidativo y de la actividad antioxidante.

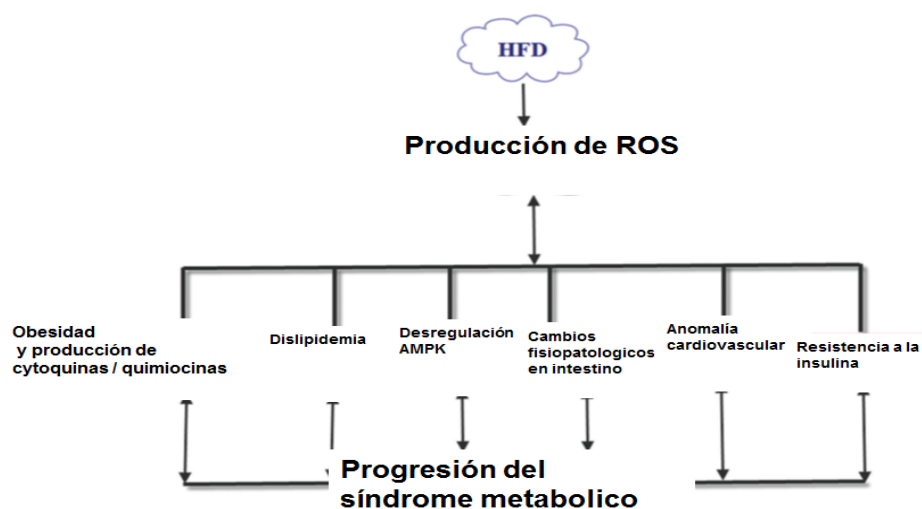


Las dietas HFD producen cambios fisiopatológicos y bioquímicos en el intestino, hígado, corazón y vasos sanguíneos que finalmente conducen a la progresión de las distintas patologías asociadas. Como es evidente a partir de la literatura, diversas dietas con composiciones de ácidos grasos muy diferentes se resumen bajo el término "dieta con alto contenido de grasa". Esto ha llevado inevitablemente a una considerable variabilidad en los resultados informados. La mayoría de los estudios emplean solo una fórmula alta en grasa en contraste con la dieta estándar, sin analizar a fondo la influencia del componente específico de la grasa en el modelo. De los escasos datos que comparan diferentes dietas altas en grasa con respecto a sus efectos metabólicos, generalmente se cree que las dietas basadas en ácidos grasos saturados inducen el típico fenotipo de dieta alta en grasas, mientras que las dietas que contienen ácidos grasos poliinsaturados contienen efectos beneficiosos sobre la composición corporal y la acción de la insulina. El papel de los ácidos grasos monoinsaturados en este contexto aún no se ha sido claramente definido (Buettner y col., 2006). Se ha demostrado que la presencia de lípidos en el lumen intestinal activa mecanismos de testeo que llevan a una disminución de la producción de glucosa en el hígado. En presencia de dietas con alto contenido de grasas, las vías sensibles a la presencia de lípidos se ven suprimidas, lo que resulta en hiperglucemia. Por otro lado, se ha informado que la presencia de alta concentración de lípidos en el duodeno activan los mastocitos de la mucosa, que responden liberando diversas moléculas mediadoras. Estas podrían aumentar el pasaje de quilomicrones hacia la lámina propia y aumentar la permeabilidad intestinal por ruptura de la unión intestinal estrecha. Por lo tanto, el consumo de dietas con alto contenido de grasa promueven, de manera directa o a través de la activación de mastocitos, la liberación de citoquinas proinflamatorias. Estos procesos inflamatorios intestinales están relacionados con adiposidad, obesidad y resistencia a la insulina. Las HFD también alteran la composición de la microbiota intestinal y aumentan el almacenamiento de grasa. Aunque el intestino está protegido por el sistema inmunológico y contiene un alto nivel de antioxidantes, la obesidad y los problemas asociados se desarrollan cuando este mecanismo de protección se ve comprometido por la presencia de exceso de grasa (Lee, 2013).

La ingesta de una HFD aumenta la cantidad de quilomicrones en el intestino. La entrada posterior en la circulación conduce a generar ácidos grasos libres (AGL) que son absorbidos por el hígado. Estos AGL hepáticos pueden ingresar a las mitocondrias para la oxidación  $\beta$  o pueden esterificarse para formar triglicéridos (TG). Estos últimos se acumulan en los hepatocitos como diminutas gotitas o producen lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) que a su vez se convierten en LDL, cuyo exceso en plasma genera un aumento en la cantidad de LDL<sub>ox</sub> con las consecuencias explicadas en el Capítulo 2. Por otro lado, el aumento de la oxidación  $\beta$  mitocondrial de los AGL conduce a un exceso de flujo de electrones mediante la citocromo-c oxidasa y de ese modo aumenta la producción de ROS. Además, como ya se ha mencionado en el Capítulo 3, las mitocondrias son la fuente celular más importante de ROS, con las que los lípidos insaturados de los depósitos de grasa reaccionan causando la peroxidación de los mismos.

Los intermediarios generados reaccionan con el oxígeno para formar más anión superóxido y otras ROS. La peroxidación lipídica y las ROS pueden consumir enzimas antioxidantes y también vitaminas. El agotamiento de estas sustancias protectoras puede dificultar la inactivación de ROS e incrementar la peroxidación lipídica y el daño mediado por ROS. Por otro lado se ha establecido una estrecha relación entre la ingesta de HFD, la generación de ROS y la adipogénesis, es decir el aumento de adipocitos, lo que a su vez genera disfunción en el tejido adiposo (asociada a mas generación de ROS) y secreción de citoquinas proinflamatorias. La inflamación crónica producida es uno de los factores relacionados al aumento de la resistencia a la insulina, es decir, menor actividad biológica de la hormona con consecuencias en sus diferentes acciones metabólicas, siendo la más evidente aquella sobre el metabolismo de la glucosa (Kesh y col., 2016).

En el **Esquema 5.1** se muestra un resumen de los procesos asociados a la formación de ROS por el consumo de dietas con alto contenido en grasa.



Esquema 5.1. Generación de estrés oxidativo y demás problemas por ingesta de HFD. Adaptado de Kesh y col., 2016.

Por todo lo nombrado anteriormente, en este trabajo se decidió utilizar un modelo animal de ratas Wistar a las que se les administrará una dieta HDF a fin de inducir estrés oxidativo que permita determinar distintos biomarcadores del mismo.

## OBJETIVOS

### Objetivo general

El objetivo de este capítulo fue evaluar el efecto de la incorporación de aislado proteico de amaranto *Amaranthus mantegazzianus* (A) en la dieta de ratas Wistar sobre parámetros del estado oxidativo de diferentes tejidos, tales como intestino, plasma e hígado.

### Objetivos específicos

- Optimizar el manejo experimental de un ensayo de inducción de estrés oxidativo con una dieta alta en grasas en ratas Wistar y los procesos de obtención de muestras y los ensayos de biomarcadores que permitan evaluar el posible efecto fisiológico provocado por el consumo de las dietas en estudio.
- Evaluar el efecto de la incorporación de proteínas de amaranto en la dieta en plasma, hígado y colon de las ratas, analizando dos tipos de administraciones de dichas proteínas: una administración “crónica” y una administración “aguda”.
- Comparar los resultados *in vivo* con los obtenidos *in vitro* en los capítulos anteriores.

### 5.1. Elaboración de dietas

Las dietas que se utilizan para estudios nutricionales requieren alteraciones en uno o más ingredientes principales como la grasa o la fuente de proteínas. Esto implica ajustes en la composición para asegurar la cantidad adecuada de nutrientes (Reeves y col., 1993). Dado que el objetivo es preparar una dieta homogénea, especialmente con respecto a los componentes que se encuentran en concentraciones bajas, se debe evitar la variación en la composición a lo largo del período de ensayo asegurando la pureza de vitaminas y minerales, protegiendo de la oxidación las fuentes de grasas a utilizar, especialmente las de elevado grado de insaturación. En función de estas premisas, se obtuvieron 5 dietas de composiciones diferentes tomando como base la dieta AIN93M. Esta dieta se diseñó a partir de un consenso internacional dada la necesidad de estandarizar los estudios entre laboratorios y está recomendada para el mantenimiento de roedores adultos (Reeves y col., 1993). Las dietas fueron preparadas en la Cátedra de Nutrición y Bromatología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Buenos Aires, siguiendo en orden una serie de pasos (Lado y col., 2015): en todos los casos se mezclaron primero los componentes sólidos comenzando con el agregado de aquel que se encontraba en menor proporción; esta premezcla sólida se volcó en una mezcladora de paletas girando a velocidad fija; con la mezcladora en funcionamiento se añadieron los componentes líquidos, que incluían a la vitamina A, colina y aceite de soja. El mezclado se realizó a temperatura ambiente, durante 15 min. Finalizada la preparación de cada una de las dietas, se las almacenó en tarros de plástico con cierre hermético bajo refrigeración (4 °C). Los ingredientes utilizados fueron:

- Caseína láctica: 92 % de proteína según especificaciones del proveedor (Droguería Industrial Lanús SA, DILSA).
- Dextrina (COFEM)
- Aceite de soja: libre de antioxidantes (Molinos Río de La Plata)
- Fibra: celulosa microcristalina (SIGMA)
- Colina (cloruro) (SIGMA)
- L-cistina: >99% (ANEDRA)
- Mezcla de vitaminas: conteniendo: ácido nicotínico, ácido pantoténico, piridoxina, tiamina, riboflavina, ácido fólico, biotina, vitamina B12, vitamina K, A, E y D.
- Mezcla de minerales: conteniendo calcio, fósforo, magnesio, potasio, sodio, cloro, azufre inorgánico, hierro, zinc, manganeso, cobre, yodo, molibdeno, selenio, cromo, flúor, níquel, silicio, boro, litio y vanadio.
- Vitamina E: acetato de  $\alpha$ -tocoferol (SIGMA)
- Colesterol (SIGMA)

- Grasa porcina (ESANI, Argentina).
- Aislado de amaranto: se preparó como se indicó en la sección 1.1 de Materiales y Métodos del Capítulo 1: a partir de la harina desgrasada de *Amaranthus mantegazzianus* mediante una extracción a pH = 9, precipitación isoeléctrica a pH = 5, neutralización y liofilización (Martínez y Añón, 1996). La composición del aislado también se muestra en el Capítulo 1, sección 1.B (Resultados y Discusión); el contenido proteico fue de  $78,39 \pm 0,05$  %.

Las dietas preparadas fueron:

- Dieta básica control (AIN93M).
- Dieta COL+G: adicionada con 2% p/p de colesterol y 10% p/p de grasa porcina
- Dieta COL+ G+E: adicionada con colesterol 1 % p/p + vitamina E 0,005 % p/p
- Dieta COL+G+A1: adicionada con 2% p/p de colesterol, 10 % de grasa porcina y aislado de amaranto reemplazando el 25 % de la caseína por proteína de amaranto.
- Dieta COL+G+A2: adicionada con 2% p/p de colesterol, 10 % de grasa porcina y aislado de amaranto reemplazando el 50 % de la caseína por proteína de amaranto

La formulación de cada una de las dietas se muestra en la **Tabla 5.1**.

*Tabla 5.1. Ingredientes de las dietas administradas a los animales*

Ingrediente (g/kg)	C	COL+G	COL+G+E	COL+G+A1	COL+G+A2
Caseinato	140	140	140	104	68
Dextrina	720,7	640,7	640,7	640,7	640,7
Aceite de soja	40	-	-	-	-
Fibra	50	50	50	50	50
Colina	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
L-Cistina	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8
Mix vitaminas	10	10	10	10	10
Mix minerales	35	35	35	35	35
Vitamina E	-	-	0,05	-	-
Colesterol	-	20	20	20	20
Grasa porcina	-	100	100	100	100
Aislado Amaranto	-	-	-	36	72

Los reemplazos fueron realizados de manera de generar formulaciones isocalóricas.

## 5.2. Modelo animal y tratamiento

El protocolo descripto a continuación fue aprobado por el Comité de Bioética y Ética de la Investigación de la Facultad de Ciencias Médicas (COBIMED) de la Universidad Nacional de la Plata (Protocolo N° T04-02-2015) y está de acuerdo con normas éticas internacionales (National

research Council, National Academy Press, Whashington DC, 2010; y/o European Union Directive for Animal Experiments 2010/63/EU).

Se utilizaron como animales de experimentación ratas Wistar machos de entre 300-400 g de peso al inicio del ensayo. Las mismas fueron divididas en 5 grupos de 6 animales cada uno. Cada grupo se dividió en jaulas con 3 animales (**Imagen 5.1.**). Se mantuvieron controladas la temperatura, la humedad y la luz (ciclo de luz/oscuridad de 12 h). El alimento y el agua fueron administrados *ad libitum*. Se colocaron 3 ratas por lecho (cajas metálicas con piso de viruta) a las cuales se les realizó una marca en la oreja para poder ser identificadas: sin marca (SM), muesca en oreja izquierda (OI) y muesca en oreja derecha (OD). Las jaulas fueron alojadas en el Bioterio Central de la Facultad de Ciencias Médicas (UNLP). Se controló diariamente que tuvieran comida y agua; solo se les retiró la dieta para respetar las horas de ayuno antes del sacrificio. Se realizó un control diario del alimento ingerido en cada jaula y también se controló el peso de las ratas.



*Imagen 5.1. Disposición de animales por jaula*

En el diseño del ensayo se decidió administrar las dietas suplementadas con aislado de amaranto de dos formas: una administración con menor concentración de amaranto y por un tiempo más prolongado y la otra con una mayor concentración de amaranto durante un tiempo más corto. De esta forma, se intenta evaluar la diferencia entre una administración “aguda” y una “crónica”.

Se administró la dieta balanceada básica AIN93M (dieta control C) durante 1 semana a todos los grupos con el objetivo de que los animales se adapten a la dieta en polvo ya que al tratarse de roedores esto es fundamental. Posteriormente, 3 de los grupos fueron alimentados durante 4 semanas con su dieta específica: dieta control C, COL+G, COL+G+E, y COL+G+A1. El otro grupo fue alimentado durante 4 semanas con dieta COL+G y luego durante 1 semana con la dieta COL+G+A2. En la **Tabla 5.2** se resumen los tiempos de administración de cada dieta.

Tabla 5.2. Tiempo de administración de cada dieta.

SEMANA		1	2	3	4	5	6
DIETA	C	C	C	C	C	C	-
	COL+G	C	COL+G	COL+G	COL+G	COL+G	-
	COL+G+E	C	COL+G+E	COL+G+E	COL+G+E	COL+G+E	-
	COL+G+A1	C	COL+G+A1	COL+G+A1	COL+G+A1	COL+G+A1	-
	COL+G+A2	C	COL+G	COL+G	COL+G	COL+G	COL+G+A2

### 5.3. Obtención de muestras

Al finalizar el período de tratamiento con cada dieta y luego de 16 horas de ayuno se procedió al sacrificio de las ratas para obtener las muestras a ensayar posteriormente. Estos procedimientos fueron realizados con la colaboración del Profesor Dr. Gustavo Rinaldi.

#### 5.3.1. Anestesia

Las ratas fueron pesadas para determinar la cantidad de droga anestésica a inyectar. Se realizaron dos inyecciones intraperitoneales, una de PBS (fenobarbital sódico) 25 mg/mL y la otra de diazepam 0,25 mg/mL. Una vez dormidas se les inyectó 0,05 mL de heparina pura.

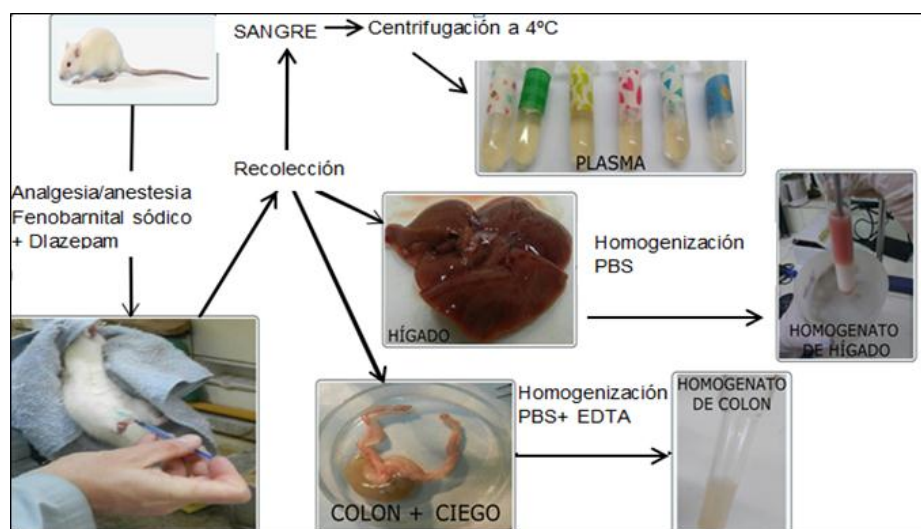
#### 5.3.2. Extracción de sangre, órganos y perfusión

Luego de la anestesia se realizó una incisión en la zona de la tráquea y se canuló la misma, conectando a un respirador artificial para ser utilizado en caso de paro cardíaco durante la intervención. Luego se abrió la zona abdominal y se ubicó la aorta, la cual se aisló con hilos y se detuvo la circulación sanguínea colocando un clamp. Se realizó un pequeño corte de la misma y se colocó una cánula de tamaño adecuado. La cánula se conectó a una manguera previamente lavada con heparina diluida (50 U/mL), se retiró el clamp y así se procedió a recolectar la sangre en tubos cónicos de 15 mL conteniendo 2 gotas de heparina pura (12.500 U/mL). Al finalizar el desangrado, se desconectó la manguera y se perfundió el animal con solución fisiológica heparinizada (50 U/mL).

**Tratamiento de las muestras de sangre:** La sangre recolectada se centrifugó inmediatamente en una centrífuga Rolco (10 min, 1000 x g, temperatura ambiente). Se separó el plasma, se lo recolectó en tubos eppendorf y se los congeló inmediatamente en nitrógeno líquido. Las muestras fueron luego almacenadas a -80°C.

**Obtención y tratamiento de órganos:** Se removió el *hígado* cuidadosamente, se pesó y se lavó con PBS frío varias veces. Posteriormente se fraccionó y se almacenó en tubos eppendorf congelando inmediatamente en nitrógeno líquido. Las muestras fueron luego almacenadas a -80°C. En el caso del *colon* se removió el contenido distal haciendo pasar buffer HBSS libre de  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Mg}^{+2}$  (NaCl 8 g/L, KCl 0,4 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  60 mg/mL, glucosa 1 g/L,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  48 mg/mL,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,35 mg/L) suplementado con Penicilina/Streptomicina a 4 °C. Las secciones de colon se

lavarón usando el mismo buffer hasta limpiar todo el contenido luminal (Tsilingiri y col., 2013). Las muestras se fraccionaron y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . En el **Esquema 5.2**, se muestran los pasos de la obtención de las distintas muestras.



*Esquema 5.2. Sacrificio y obtención de muestras.*

## 5.4. Evaluación de la actividad antioxidante

La determinación del estado oxidativo de plasma, hígado y colon y el efecto de la incorporación de proteína de amaranto en las dietas se determinó a partir de varios ensayos que miden distintos biomarcadores del estrés oxidativo en estos tejidos: FRAP, TBARS, ROS, contenido de GSH, y actividad de las enzimas antioxidantes SOD y GPx.

En nuestro laboratorio se han realizado ensayos previos sobre los efectos de la adición de aislado de *Amaranthus mantegazzianus* sobre el estado antioxidante, el perfil lipídico y la presión arterial de ratas Wistar (Lado y col., 2015). Los tratamientos de las muestras obtenidas después del sacrificio y algunas de las determinaciones fueron adaptados a partir de estos protocolos previos. Otras determinaciones se realizaron a partir de los protocolos descritos en el Capítulo 3, con algunas modificaciones, donde se evaluó el efecto de péptidos de amaranto sobre el estado oxidativo celular en cultivos de Caco-2 TC7.

### 5.4.1. Plasma

El plasma fraccionado y almacenado a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  se descongeló y se mantuvo a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta la realización de las siguientes determinaciones.

#### 5.4.1.1. Capacidad reductora del hierro del plasma (FRAP)

El método de FRAP ("Ferric Reducing Ability of Plasma") permite cuantificar la capacidad de los antioxidantes presentes en el plasma de reducir la tripiridil-triazina férrica ( $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ) a la forma ferrosa ( $\text{Fe}^{+2}$ -TPTZ), la cual tiene una absorbancia máxima a 593 nm (Mora y col., 2009). Para su determinación se incubaron 200  $\mu\text{L}$  de reactivo FRAP (2,5 mL de TPTZ 10 mM en HCl 40 mM + 2,5 mL de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  20 mM + 25 mL de buffer acetato 0,3 M, pH = 3,6) recién preparado a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se realizó una lectura (blanco) a 593 nm; luego se agregaron 7  $\mu\text{L}$  de muestra y 20  $\mu\text{L}$  de



H<sub>2</sub>O y se leyó la absorbancia luego de 8 minutos de reacción, calculándose el cambio de absorbancia entre la lectura final y la inicial. Se preparó una curva de calibración con de Fe<sup>+2</sup> con concentraciones de Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O entre 25 y 250 µM (Benzie y Strain, 1996). La capacidad reductora del hierro correspondiente a las distintas muestras de plasma fue obtenida a partir de los parámetros de las respectivas curvas de calibración, expresándose la capacidad reductora en µmol de Fe<sup>+2</sup>/L de plasma (µM).

#### **5.4.1.2. Evaluación de la prevención de la oxidación de lípidos**

La determinación de los productos de oxidación lipídica se realizó a partir de la determinación de las TBARS en base a un protocolo previamente diseñado en nuestro laboratorio (Lado y col., 2015) con algunas modificaciones. Se mezclaron 30 µL de plasma con 500 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,083 N. Luego se agregaron 125 µL de ácido fosfotúngstico 10% p/v, se mezcló y se dejó 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó a 13000 x g, 3 min descartando el sobrenadante (Yagi, 1976). Se resuspendió el pellet en 200 µL de agua MiliQ y se agitó 30 min en termomixer (Eppendorf™ Thermomixer™ R). Finalmente se añadieron 600 µL de reactivo de TBA (TBA 0,7% en agua:ácido acético 1:1) y se llevó a un baño de agua a 95 °C durante 60 min, luego de enfriar se centrifugó a 1000 x g, 10 min (Buege y Aust, 1975) y se leyó la fluorescencia del sobrenadante ( $\lambda_{exc} = 515 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 553 \text{ nm}$ ). Se realizó una curva de calibración con tetraetilpropano (TEP) con concentraciones entre 0 y 0,5 nmoles. El contenido de MDA se expresó por mL de plasma.

#### **5.4.1.3. Efecto sobre la actividad de superóxido dismutasa (SOD).**

El fundamento de este ensayo es el descrito en la sección 3.7 del Capítulo 3. Para la determinación se colocaron en una microplaca 20 µL de la muestra (el plasma fue previamente diluido 1/2) o 20 µL de agua MiliQ en el caso del blanco. Se añadieron 200 µL de la sal de tetrazolio WST y 20 µL de la enzima de trabajo (XO) y se incubó a 37 °C durante 60 min. Se leyó la absorbancia a 450 nm en un lector de microplacas (BIOTEK Instruments, SYNERGY-HT). La actividad de la SOD se determinó a partir de la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad SOD}/\mu\text{L plasma} = [(A_{\text{blanco}} - A_{\text{muestra}})/(A_{\text{blanco}})] \times 100 / V \text{ plasma} \quad \text{Ecuación 5.1}$$

V plasma: µL de plasma

#### **5.4.1.4. Efecto sobre la concentración de glutatión reducido (GSH).**

El fundamento de este ensayo es el descrito en la sección 3.7 del Capítulo 3. La reacción se llevó a cabo en una microplaca mediante la adición de 5 µL de solución de enzima GST a 50 µL de muestra. La reacción se inició con el agregado de 2,5 µL de sustrato e incubación a 37 °C durante 60 min. Se leyó la fluorescencia (lector de microplacas, BIOTEK INSTRUMENTS, SYNERGY-HT) ( $\lambda_{exc} = 390 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 478 \text{ nm}$ ). El volumen final de la mezcla de reacción fue de 100 µL. Paralelamente se realizó una curva de calibración con GSH (1,3 a 7,5 nm) a partir de la cual se calculó el contenido de GSH que se expresó por mL de plasma.

#### 5.4.2. Hígado y colon

Además del plasma se analizaron el hígado y el colon de las ratas, para esto se prepararon los homogenatos correspondientes y sobre estos se realizaron las determinaciones del estado oxidativo.

**Homogenato de hígado:** las muestras de hígado que estaban fraccionadas y almacenadas a -80 °C se descongelaron cuidadosamente y se mantuvieron en hielo hasta la toma de las muestras. Se prepararon los homogenatos colocando 1 g de hígado en 10 mL de buffer PBS frío. Se homogenizó en hielo, con Ultraturrax T8.01 (IKA) durante 6 min a 400 rpm. Se centrifugó a 10000 g, durante 5 min a 4 °C. Se separó el sobrenadante y se almacenó a -80 °C hasta el momento de su utilización (Mohan-Kumar, y col., 2011; Noeman y col., 2011). Sobre este homogenato de hígado se evaluó la prevención de la oxidación de lípidos (TBARS), actividad de enzimas antioxidantes (SOD y GPx) y contenido de GSH.

**Homogenato de colon:** se homogeneizaron 500 mg de las muestras previamente descongeladas y mantenidas en hielo con 5 mL de PBS conteniendo EDTA (1mM) (pH 7,4) frío (Almasaudi y col., 2015 y Pinent y col., 2016) en Ultraturrax: (8 min, 500 rpm). Finalmente se separaron restos sólidos y se centrifugó a 3000 × g durante 5 min a 4 °C. Se separó y fraccionó el sobrenadante almacenando a -80 °C hasta el momento de su utilización. Sobre este homogenato de colon se evaluó el contenido de ROS, la actividad de enzimas antioxidantes (SOD y GPx) y contenido de GSH.

Se determinó la cantidad de proteína presente en ambos homogenatos por el método desarrollado por Bradford (1976). Este método se basa en la unión del colorante coomasie G-250 con las proteínas.

##### 5.4.2.1. Evaluación de la prevención de la oxidación de lípidos en hígado

La determinación de los productos de oxidación lipídica presentes en los homogenatos de hígado se realizó a partir del mismo protocolo señalado para el plasma (5.3.1.2). El contenido de MDA se expresó por mg de proteína.

##### 5.4.2.2. Determinación de especies reactivas del oxígeno (ROS) en colon

En el tracto gastrointestinal la presencia de ROS es significativa debido a que se encuentra expuesto a las ROS presentes en los alimentos y a que estas especies reactivas también se generan en este tejido dentro de las células y por reacciones químicas de componentes de la dieta dentro del estómago. Por este motivo, este tejido está altamente expuesto al estrés oxidativo. A fin de evaluar el efecto de la incorporación de aislado proteico de amaranto en la dieta se evaluó el contenido de ROS en homogenatos de colon. La medida se realizó, como en el Capítulo 3 (sección 3.5) utilizando la sonda DCFH-DA. Para la determinación se agregaron 50 µL de DCFH-DA 20 µM a 50 µL de homogenato de colon. Se incubó durante 3 h a 37 °C determinando fluorescencia en lector de placas ( $\lambda_{exc} = 485 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 528 \text{ nm}$ ) cada 10 min durante 1 h (Pinent y col., 2016). Dado que en este caso el objetivo es determinar el contenido de ROS intracelulares

presentes en las células de la pared intestinal de las ratas, no se realizó un proceso de inducción de la oxidación como en el Capítulo 3. El contenido de ROS se calculó a partir de la Ecuación 5.2.

$$\text{ROS}/\mu\text{g proteína} = (F_{60\text{min}} - F_{0\text{min}}) / m \text{ proteína} \quad \text{Ecuación 5.2.}$$

m proteína:  $\mu\text{g}$  de proteína presentes en el volumen de homogenato utilizado en la reacción.

#### **5.4.2.3. Efecto sobre la actividad de enzimas antioxidantes y GSH en hígado y colon**

EL efecto de la incorporación del aislado proteico de amaranto en la dieta de las ratas Wistar también se determinó midiendo la actividad de las enzimas de primera línea de defensa antioxidante celular SOD, GPx y sobre el contenido de GSH de hígado y colon. Estas determinaciones se realizaron sobre los homogenatos de ambos tejidos.

**Actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD):** Esta determinación se realizó como se describió en el punto 6.4.3.1. de esta sección para el plasma (igual que en el Capítulo 3). Para el caso del homogenato de hígado se utilizaron 4  $\mu\text{L}$  de la muestra diluída 1/20, mientras que en el caso de colon se utilizaron 20  $\mu\text{L}$  de la muestra previamente diluida 1/20. Se calculó la actividad de SOD por  $\mu\text{g}$  de proteína según la Ecuación 5.3.

$$\text{Actividad SOD}/\mu\text{g de proteína} = [(A_{\text{blanco}} - A_{\text{muestra}})/(A_{\text{blanco}})] \times 100 / m \quad \text{Ecuación 5.3}$$

m:  $\mu\text{g}$  de proteína presentes en la muestra de homogenato.

**Actividad de la enzima Glutación peroxidasa (GPx).** Esta determinación se realizó como se describió en la sección 3.7 del Capítulo 3). En este caso también la reacción se inició agregando  $\text{H}_2\text{O}_2$  en una concentración final de 0,1 mM en el caso del homogenato de hígado y 0,2 mM en el caso del homogenato de colon, bloqueando la catalasa con  $\text{NaN}_3$  1 mM y ajustando el pH del buffer de ensayo a 7. El ensayo se realizó a 25 °C. Se mezclaron 10  $\mu\text{L}$  de reactivo de ensayo NADPH con 10  $\mu\text{L}$  de homogenato de hígado o 15  $\mu\text{L}$  de homogenato de colon y 40  $\mu\text{L}$  de  $\text{NaN}_3$  5 mM. La reacción se inició agregando 10  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  2 mM en el caso del hígado y 4 mM en el caso del colon. Para llevar el volumen final de la reacción a 200  $\mu\text{L}$  se utilizó el buffer de ensayo mantenido a 25 °C y a pH = 7. Se determinó la disminución de la absorbancia a 340 nm midiendo cada 10 seg durante 60 seg, posterior a un tiempo de reposo inicial de 15 seg (lector de microplacas BIOTEK INSTRUMENTS, SYNERGY-HT). Paralelamente a las muestras se realizó un blanco en el que la muestra se reemplazó por buffer de ensayo (máxima absorbancia). La actividad de la GPx en la muestra se determinó mediante la siguiente ecuación (Ecuación 5.4):

$$\text{Actividad (U/mg prot)} = [(\Delta A/\text{min})_{\text{blanco}} - (\Delta A/\text{min})_{\text{muestra}}]/(6,22 \times m) \quad \text{Ecuación 5.4}$$

$$(\Delta A/\text{min}) = \text{Diferencia de absorbancia por minuto} = (A_{75\text{seg}} - A_{15\text{seg}})/(60 \text{ seg})$$

$$6,22 = \epsilon \text{ (mM) del NADPH}$$

$$m = \text{masa de proteína presente en la muestra (mg)}$$

**Determinación del contenido de GSH.** Se realizó mediante el método descrito en la sección 3.8 (Capítulo 3). En el caso del hígado, la reacción se llevó a cabo en una microplaca mediante la adición de 5  $\mu\text{L}$  de solución de enzima GST a 20  $\mu\text{L}$  de homogenato de hígado o 40  $\mu\text{L}$  de homogenato de colon. La reacción se inició con el agregado de 2,5  $\mu\text{L}$  de sustrato e incubación a 37 °C durante 60 min. El volumen final de la mezcla de reacción fue de 100  $\mu\text{L}$  (se utilizó el buffer

provisto por el kit). Se leyó la placa en el lector de placas ( $\lambda_{\text{exc}} = 390 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 478 \text{ nm}$ ). Se realizó una curva de calibración con GSH (1,3 a 7,5 nM) y a partir de esta se determinó los mmoles de GSH por  $\mu\text{g}$  de proteína presente en el homogenato.

#### **5.5. Análisis estadístico.**

A fin de comparar los distintos grupos analizados, los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante un análisis de varianza (ANAVA). Las diferencias significativas entre las medias se determinaron mediante el test de Tukey con un nivel de significación de  $\alpha = 0,05$  (95% de confianza) usando el paquete estadístico Graph Pad Prism 5.

## RESULTADOS

Para la evaluación del efecto de la incorporación de aislado proteico de amaranto sobre parámetros relacionados con el estrés oxidativo en ratas Wistar se seleccionó como modelo de inducción del estrés oxidativo una dieta de alto contenido en grasa (HFD); el efecto esperado de la utilización de esta dieta es que el alto contenido en grasas saturadas genere un proceso oxidativo a nivel celular y sistémico. Por otro lado, la incorporación del aislado de amaranto en la dieta de las ratas se realizó de dos formas: 1) incorporando el aislado proteico durante un tiempo prolongado y a menor concentración intentando generar un efecto preventivo del mismo, y 2) administrando el aislado proteico por un tiempo más corto y a mayor concentración, luego de haber inducido un estado de estrés, con el objetivo de ver el efecto de un tratamiento agudo y reparador/crónico. Se utilizó como dieta control la dieta AIN93M recomendada para el mantenimiento de ratas adultas (C), y en base a ésta se formularon las otras dietas: la dieta con alto contenido de grasa (COL+G), una segunda dieta control con el agregado de un antioxidante de actividad conocida (Vitamina E) (COL+G+E), y las dietas con alto contenido en grasa e incorporación de amaranto (COL+G+A1 y COL+G+A2). Los animales fueron alimentados diariamente, manteniendo la higiene de las jaulas y controlando el consumo de alimento y la evolución del peso corporal de los animales.

A continuación se presentarán los resultados obtenidos y posteriormente se realizará una discusión integral de los mismos.

### 5.A. Peso de los animales y consumo de alimento

En la **Tabla 5.3** se muestran los valores correspondientes al peso de los animales al comienzo del ensayo, el peso que tenían al momento del sacrificio y la cantidad de alimento ingerido por los mismos durante todo el tratamiento. Al observar los datos de la tabla podemos ver que la ganancia de peso en el caso del grupo control fue nula y de hecho se registró una pérdida de peso, mientras que ocurrió una ganancia significativa en el grupo con la incorporación de 10 % de grasa porcina, indicando un efecto de la misma. En cuanto a las dietas con el agregado de amaranto el grupo COL+G+A1 (tiempo más corto de consumo de amaranto) presentó mayor ganancia que C, mientras en los otros casos no se encontraron diferencias significativas. Estos resultados indican un efecto de la dieta con alto contenido de grasa en el metabolismo de los animales lo que se tradujo en un aumento del peso de los mismos.

Tabla 5.3. Peso de los animales y consumo de alimento

Dieta/Grupo	Peso inicial (g) <sup>a</sup>	Peso final (g) <sup>a</sup>	Ganancia de peso (g) <sup>A</sup>	Consumo alimento/día/animal (g) <sup>B</sup>
C	375 ± 18	374 ± 20	-14 ± 14 <sup>a</sup>	16 ± 1
COL+G	379 ± 17	416 ± 23	71 ± 32 <sup>b</sup>	19 ± 1
COL+G+E	320 ± 16	362 ± 17	38 ± 3 <sup>ab</sup>	16 ± 1
COL+G+A1	345 ± 9	396 ± 10	61 ± 10 <sup>b</sup>	18 ± 1
COL+G+A2	346 ± 12	374 ± 8	28 ± 17 <sup>ab</sup>	18 ± 1

<sup>A</sup> Los resultados son el promedio ± SD de 6 animales.

<sup>B</sup> Promedio obtenido a partir de los datos de cada jaula (2 jaulas por grupo)

Letras minúsculas distintas en la misma columna indican diferencias significativas.  $p < 0,05$ )

## 5.B. Evaluación del efecto de las dietas sobre parámetros del plasma

Como se mencionó en el Capítulo 3, actualmente la definición de antioxidante está ampliamente ligada al efecto biológico que este puede ejercer de manera directa o indirecta. Este punto de vista incluye no solamente a los sustratos oxidables presentes en la célula (lípidos, proteínas, ADN y carbohidratos) sino también los mecanismos intracelulares involucrados incluyendo el efecto de los antioxidantes sobre enzimas de defensa antioxidante intracelular, factores de transcripción, proteínas estructurales, concentración de glutatión reducido (GSH) y demás antioxidantes endógenos celulares. Por lo tanto, los cambios en las actividades de enzimas antioxidantes así como el contenido de GSH pueden considerarse biomarcadores de la respuesta antioxidante (Wu y col., 2017) y, al igual que en el Capítulo 3 donde se utilizaron estos biomarcadores para determinar el efecto de péptidos de amaranto en el modelo Caco-2 TC7, se analizaron para esta evaluación *in vivo*. El efecto de la incorporación de amaranto en la dieta en el plasma de las ratas se determinó a partir de los ensayos FRAP, TBARS, la actividad de SOD y contenido de GSH.

### 5.B.1. FRAP

Se determinó la capacidad del plasma de los animales de reducir el  $\text{Fe}^{+3}$  a  $\text{Fe}^{+2}$  midiendo la diferencia de absorbancia (593 nm) entre el reactivo de FRAP (blanco) y la muestra agregada al reactivo luego de 8 min de incubación. En la **Figura 5.1** se muestra una curva de calibración realizada con concentraciones de  $\text{Fe}^{+2}$  entre 25 y 250  $\mu\text{M}$ .

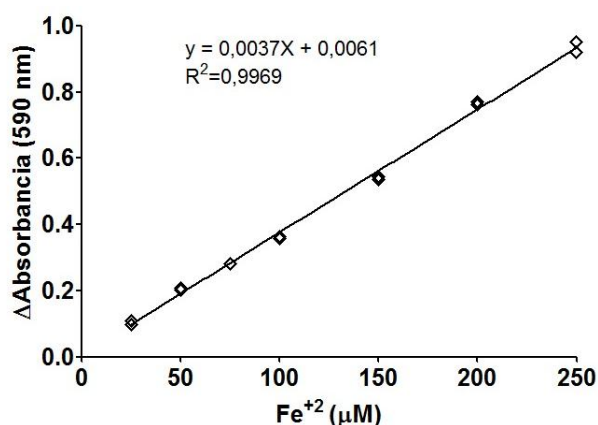


Figura 5.1. Curva de calibración para el ensayo FRAP

A partir de las curvas de calibración, se obtuvo la capacidad reductora del hierro correspondiente a las distintas muestras de plasma. Los datos obtenidos se muestran en la **Figura 5.2**.

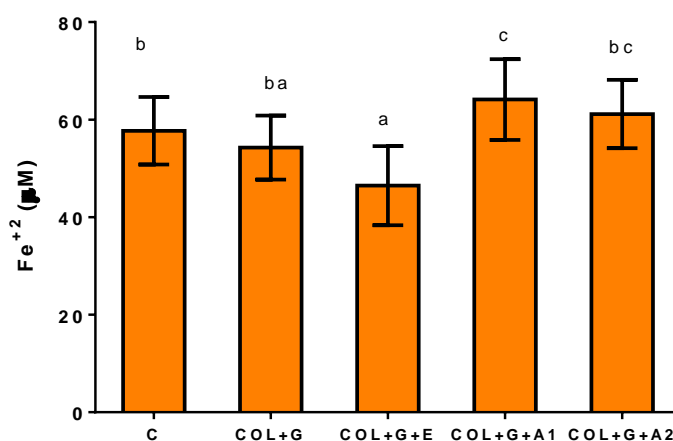


Figura 5.2. Capacidad reductora de hierro en plasma de grupos de animales (6) alimentados con distintas dietas. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

En primer lugar, no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre el grupo alimentado con la dieta C ( $58 \pm 7 \mu\text{M}$  de  $\text{Fe}^{+2}$ ) y el grupo alimentado con la dieta COL+G ( $54 \pm 7 \mu\text{M}$  de  $\text{Fe}^{+2}$ ), indicando que la grasa incorporada a la dieta no tuvo efecto sobre la capacidad reductora de hierro total del plasma. Los animales alimentados con COL+G+E no presentaron diferencia significativa con COL+G, indicando que la adición de 0,005% de vitamina E no tuvo capacidad para aumentar el poder reductor del plasma, e incluso se observó una disminución significativa con respecto al grupo C. En cuanto al efecto de la incorporación de amaranto, la dieta COL+G+A1 ( $64 \mu\text{M}$  de  $\text{Fe}^{+2}$ ) y COL+G+A2 ( $61 \mu\text{M}$  de  $\text{Fe}^{+2}$ ) presentaron un aumento en el parámetro FRAP respecto a COL+G que fue estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ) solo para COL+G+A1. Estos resultados indican que el consumo de aislado de amaranto (3,6 % p/p, 25 % de reemplazo de proteína, durante 4 semanas) produjo un aumento en la capacidad antioxidante total del plasma, es decir una mayor presencia de antioxidantes en el plasma. En trabajos previos de nuestro laboratorio se encontró que las dietas agregadas con vitamina E no mostraron ningún incremento

en los valores de FRAP y esto podría estar relacionado con su carácter liposoluble; en estos mismos trabajos se encontró un efecto positivo de la incorporación de amaranto que se vio reflejado en un aumento del valor de FRAP en la dieta donde se agregó junto al colesterol (Lado y col., 2015).

### 5.B.2. Oxidación de lípidos (TBA).

La determinación del nivel de oxidación de lípidos en las distintas muestras de plasma se realizó a partir del método de TBA y mediante la preparación de una curva de calibración con TEP. Como se mencionó en el Capítulo 3, el método de TBA es el más utilizado en el análisis de la peroxidación lipídica en sistemas biológicos y se basa en la reacción de productos finales de la misma con el TBA para producir un aducto de color rojo. Dado que los productos finales de la peroxidación lipídica reaccionan con TBA, originando el mismo producto que genera la reacción entre TBA y malonaldehído (MDA), este compuesto es apropiado para utilizar como estándar. Experimentalmente se utiliza el 1,1,3,3 tetraetoxipropano (TEP), ya que es convertido cuantitativamente a MDA después de calentarse en solución ácida (Yagi, 1976). En la **Figura 5.3** se muestra una de las curvas de calibración realizadas para la determinación de MDA.

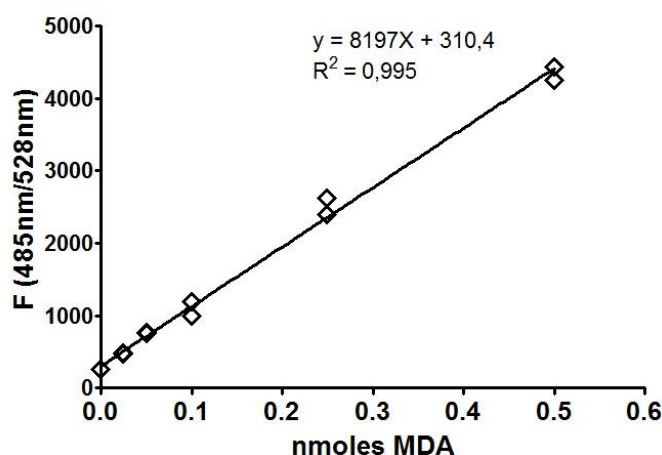


Figura 5.3. Curva de calibración para determinar el contenido de TBARS.

En la **Figura 5.4** se muestran los valores de MDA ( $\mu\text{M}$ ) en el plasma de los animales de los distintos grupos.



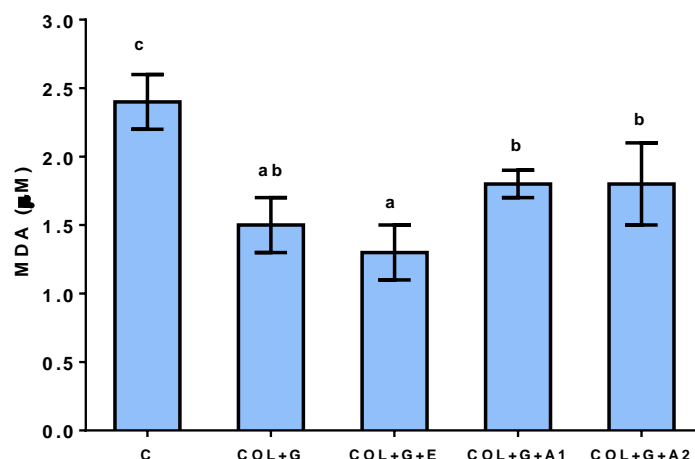


Figura 5.4. Oxidación de lípidos (TBARS) en plasma de grupos de animales (6) alimentados con diferentes dietas. Los resultados se expresan como MDA ( $\mu\text{M}$ ). Diferentes letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

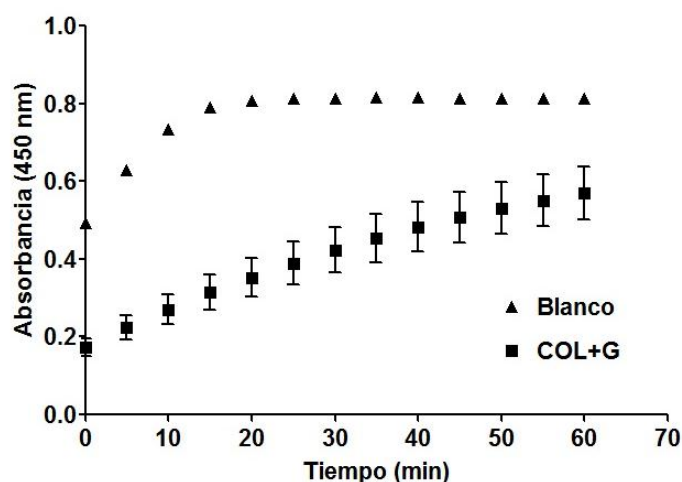
La generación de productos de oxidación lipídica en el plasma de las ratas del grupo control C (2,4  $\mu\text{M}$ ) fue, contrario a lo que se esperaba, significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) al obtenido para los otros 4 grupos. Estos resultados indican que el importante aumento en el contenido de grasas (incluido el colesterol) en la dieta no generó un aumento de oxidación de lípidos que se refleje en el contenido de productos secundarios de oxidación en el plasma, sino que, por el contrario, estas sustancias disminuyeron en la circulación. Por otra parte, los agregados de vitamina E o aislado de amaranto en ambas concentraciones no produjeron efectos significativos ( $p > 0,05$ ) en el contenido de TBARS del plasma respecto al grupo COL+G, aunque en el caso de la vitamina E se observa una tendencia a la disminución.

### 5.B.3. Actividad de la SOD

Con el objetivo de estudiar posibles mecanismos por los cuales el consumo de aislado proteico de amaranto podría ejercer un efecto antioxidante intracelular *in vivo* se evaluó la actividad de la enzima SOD en el plasma de las ratas Wistar de todos los grupos evaluados. En el organismo existe un nivel basal de SOD, el cual es susceptible a determinadas sustancias. En células eucariotas, se han descrito dos superóxido dismutasas intracelulares la Cu,ZnSOD y la MnSOD. Cu,ZnSOD, la isoenzima más abundante y ubicua es un homodímero de 32 kDa presente en el citoplasma y en el núcleo de las células eucariotas, donde actúa como un gran secuestrante de radicales superóxido (Rojo y col., 2004). La MnSOD es un homotetrámero de 96 kDa que se encuentra principalmente en la matriz mitocondrial. La pérdida o disfunción de cualquiera de estas enzimas ha sido asociada con patologías mediadas por especies reactivas del oxígeno. En 1982, fue descubierta la enzima superóxido extracelular de 135 kDa, EC-SOD, forma predominante de la SOD en los fluidos extracelulares. La localización primaria de esta enzima, además de la matriz extracelular, es la superficie celular. Su distribución tisular varía entre especies, pero en general

se encuentra en concentraciones más altas en los vasos sanguíneos, pulmón, riñón y útero, mientras que se encuentra en una baja cantidad en el ojo, el músculo esquelético, el hígado y el cerebro. En individuos jóvenes hipercolesterolémicos, la actividad de la EC-SOD unida al endotelio vascular se incrementa, posiblemente en un intento temprano del organismo por contrarrestar el deterioro de la función endotelial (Fattman y col., 2003).

En la **Figura 5.5** se presentan las curvas de determinación de la actividad SOD obtenidas para el blanco de reacción y el grupo COL+G donde se observa un máximo aumento de absorbancia (450 nm) en función del tiempo para el blanco (ausencia de SOD). Como se explicó anteriormente, el agregado de SOD proveniente de la muestra a la mezcla de reacción reduce los niveles de ión superóxido, lo que reduce la velocidad de formación de formazán produciendo un menor cambio de absorbancia a 450 nm. Si bien esta diferencia de absorbancia entre el grupo COL+G y el blanco se puede ver en todos los tiempos analizados se tomó para el cálculo de la actividad las absorbancias a 20 min ya que, en estos ensayos, el blanco alcanzó el máximo a este tiempo.



*Figura 5.5. Determinación de actividad SOD: curvas de aumento de absorbancia a 450 nm en función del tiempo para el blanco de reacción y el grupo COL+G.*

En la **Figura 5.6** se muestran los resultados obtenidos para el plasma de los cinco grupos de animales analizados, donde puede observarse que no se registraron diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) en ninguno de los casos. Por lo tanto, la administración de la dieta rica en grasa (COL+G) no indujo ninguna modificación en la SOD plasmática, así como tampoco la adición de vitamina E o de aislado de amaranto.

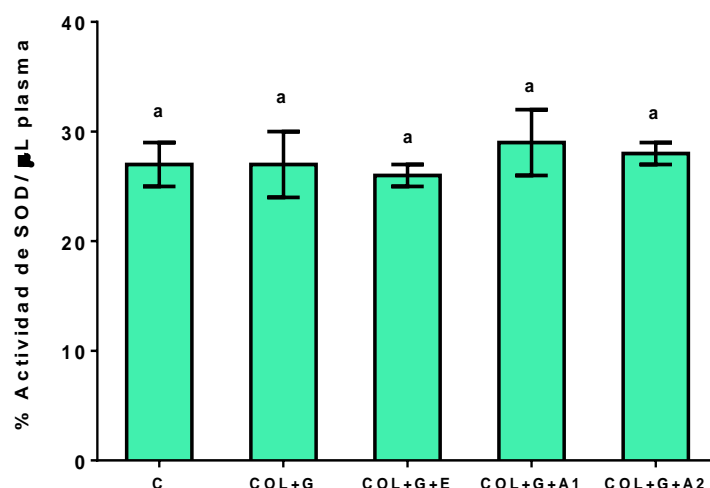


Figura 5.6. Actividad de SOD en plasma de grupos de animales (6) alimentados con las diferentes dietas. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

#### 5.B.4. Contenido de GSH.

También se determinó el efecto sobre el glutatión reducido (GSH), uno de los antioxidantes endógenos más importantes. Para esta determinación se preparó una curva de calibración, tal como se muestra en la **Figura 5.7**.

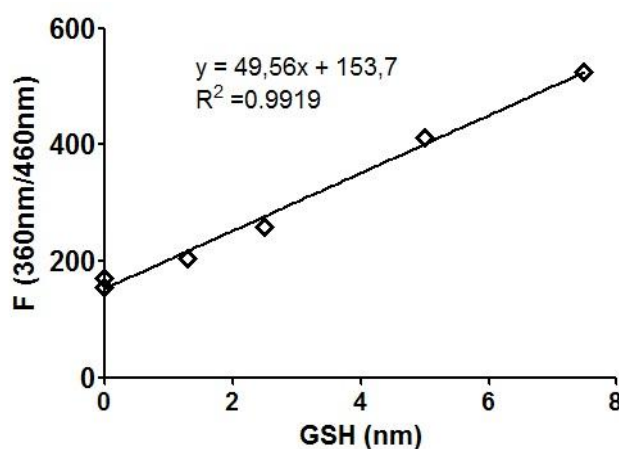


Figura 5.7. Curva de calibración con distintas concentraciones de GSH

Cuando se determinó el contenido de GSH en los plasmas de los animales de los cinco grupos experimentales se obtuvieron los resultados mostrados en la **Figura 5.8**. No se evidenciaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los valores correspondientes a los grupos C, COL+G y COL+G+E. La incorporación de aislado proteico de amaranto tampoco indujo una modificación significativa ( $p > 0,05$ ) respecto al grupo COL+G, aunque se observó una tendencia a la disminución, especialmente en el caso de COL+G+A2 (aproximadamente 25 %).

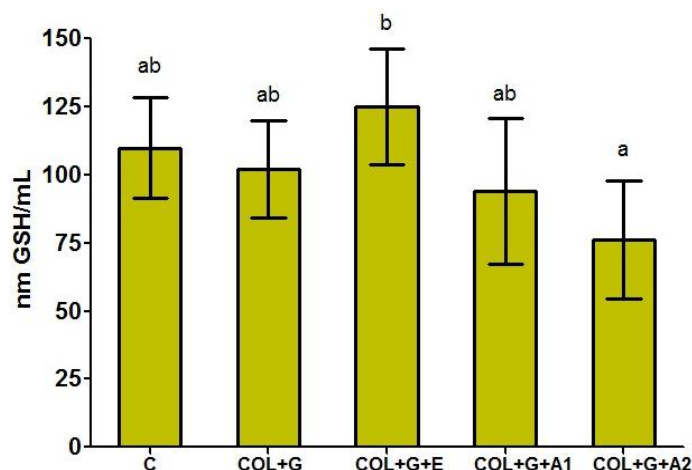


Figura 5.8. Contenido de GSH en plasma para los grupos de animales (6) alimentados con las diferentes dietas. Diferentes letras significan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

### 5.C. Evaluación del efecto de las dietas sobre parámetros del hígado.

El efecto de la incorporación de aislado de amaranto de la dieta de ratas Wistar también fue evaluado sobre el hígado. Para ello, se prepararon los homogenatos en PBS a fin de poder determinar los distintos biomarcadores intracelulares relacionados con el estrés oxidativo.

#### 5.C.1. Oxidación de lípidos (TBARS)

El procedimiento se realizó de forma similar al realizado en el caso de la oxidación de lípidos en el plasma, mediante el método de TBA y realizando una curva de calibración con TEP. En la **Figura 5.9** se muestran los valores obtenidos, expresados por  $\mu\text{g}$  de proteína, para los distintos grupos evaluados.

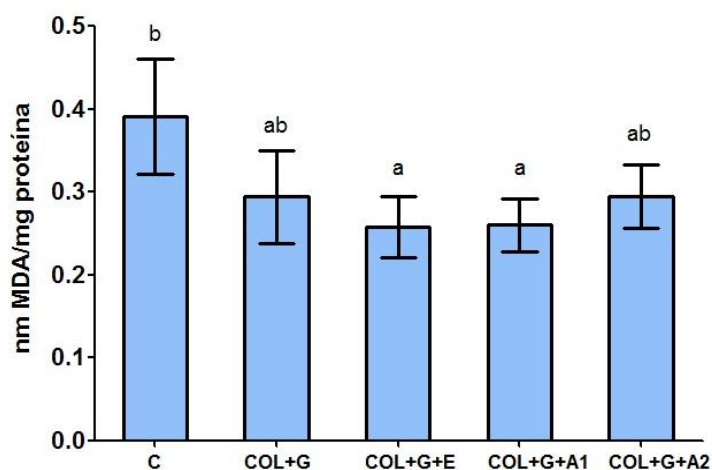
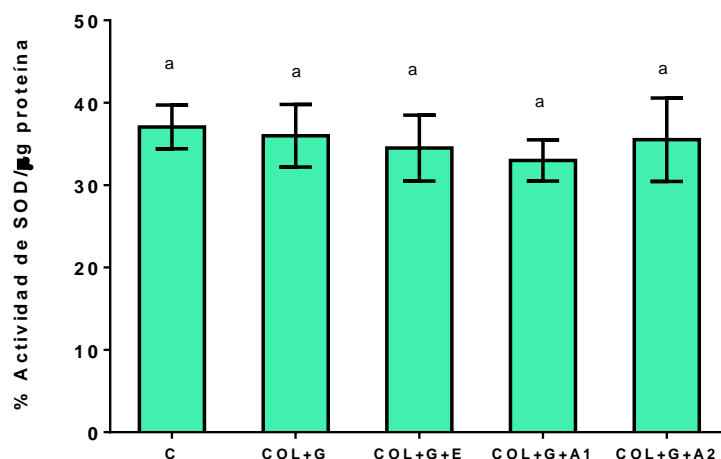


Figura 5.9. Oxidación de lípidos (TBARS) en hígado de grupos de animales (6) alimentados con diferentes dietas. Los resultados se expresan como nmoles MDA/mg de proteína. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

En el caso de la determinación de la oxidación de lípidos en este tejido no se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre el valor obtenido para el grupo alimentado con la dieta COL+G (0,29 nmoles MDA/mg proteína) y los valores obtenidos para el grupo control C (0,39 nmoles MDA/mg proteína), así como tampoco con el grupo COL+E (0,26 nmoles MDA/mg proteína). En función de esto, la dieta con alto contenido graso no logró generar un aumento significativo en la oxidación de lípidos en el hígado. Por otro lado, los dos grupos alimentados con aislado de amaranto no presentaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) respecto a COL+G. Estos valores (0,26 y 0,3 nmoles MDA/mg proteína) tampoco fueron significativamente diferentes entre ellos ( $p > 0,05$ ), indicando que no hubo diferencias entre la administración preventiva y la aguda del aislado.

### 5.C.2. Actividad de SOD.

Como puede observarse en la **Figura 5.10**, los cinco grupos experimentales de animales presentaron valores similares ( $p > 0,05$ ) de actividad SOD en el tejido hepático. Por lo tanto, ni el aumento del contenido graso, ni la incorporación de vitamina E o aislado proteico de amaranto produjeron algún tipo de efecto sobre esta enzima.



*Figura 5.10. Actividad SOD en hígado de grupos de animales (6) alimentados con diferentes dietas. Los resultados se expresan como nmoles MDA/μg de proteína. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).*

### 5.C.3. Determinación de la actividad de GPx

Se realizaron algunas evaluaciones preliminares donde se evaluó el volumen de muestra y la concentración de  $H_2O_2$  (utilizada como iniciador) a mezclar. También se realizó, como se hizo en las otras determinaciones de esta enzima, un control negativo (CN) sin el agregado de  $H_2O_2$  con el objetivo de evaluar la presencia en de alguna actividad endógena que utilice NADPH. En la **Figura 5.11** se graficaron algunas de las curvas obtenidas durante la evaluación preliminar. Se muestran

las curvas correspondientes a: 1) blancos (sin muestra) donde se utilizó  $\text{H}_2\text{O}_2$  4 y 2 mM, 2) 10  $\mu\text{L}$  de una de las muestras de homogenato de hígado con  $\text{H}_2\text{O}_2$  4 y 2 mM como iniciador, y 3) control negativo (muestra, sin  $\text{H}_2\text{O}_2$ ).

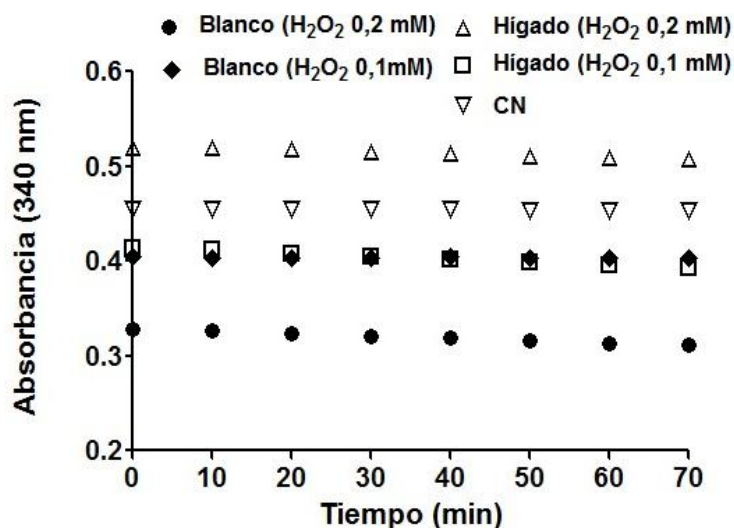


Figura 5.11 Curvas preliminares de la evaluación de la actividad de GPx en homogenatos de hígado.

Como se observa, el CN no sufrió variación de absorbancia a lo largo del tiempo indicando que en las muestras no hay actividad endógena que consuma NADPH. Por otro lado, utilizando  $\text{H}_2\text{O}_2$  2 mM (0,1 mM final) como iniciador, se obtuvo una variación de absorbancia más evidente por lo que se decidió trabajar con el protocolo final descrito en Materiales y Métodos: 10  $\mu\text{L}$  de muestra y 10  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  2 mM (concentración final 0,1 mM).

En la **Figura 5.12** se muestran los resultados obtenidos de actividad de glutatión peroxidasa para todos los grupos evaluados.

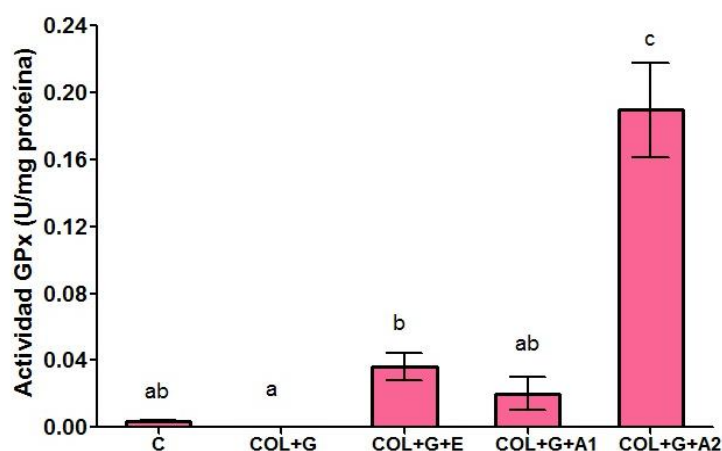
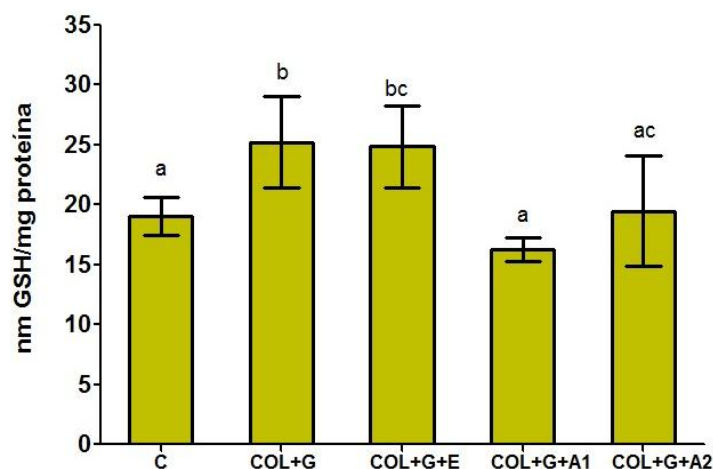


Figura 5.12. Actividad de GPx en homogenatos de hígado de los grupos de animales (6) alimentados con dietas diferentes. Letras diferentes significan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

La actividad de esta enzima en los homogenatos de los hígados de los animales no arrojó diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre la dieta COL+G y la dieta base C, presentando ambas valores muy bajos, prácticamente indetectables. En cuanto a la dieta con el agregado de vitamina E, presentó un valor significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) en la actividad de GPx (0,036 U/mg proteína). En el caso del grupo de animales alimentados con la dieta COL+G+A1 (actividad 0,02 U/mg proteína), si bien hay una tendencia al aumento de esta actividad, la diferencia no fue significativa ( $p > 0,05$ ). Sin embargo, en el caso de alimentación con la dieta COL+G+A2 se evidenció un aumento importante y significativo ( $p < 0,05$ ) de la actividad GPx hepática (0,19 U/mg proteína).

#### 5.C.4. Contenido de GSH

La determinación del contenido de GSH en los homogenatos de hígado se realizó de manera similar al procedimiento realizado en el plasma a partir de la formación del aducto entre la sonda monoclorobimano y el GSH de la muestra. Se utilizó para la cuantificación una curva de calibración con GSH estándar, como la mostrada en la sección anterior. En la **Figura 5.13** se muestran los resultados obtenidos para los homogenatos de hígado.



*Figura 5.13. Contenido de GSH en homogenatos de hígado (nmol/mg proteína) de grupos de animales (6) alimentados con diferentes dietas. Letras diferentes significan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).*

El contenido de GSH que presentó el grupo alimentado con COL+G fue significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) que el presentado por el grupo C y no presentó diferencias significativas con el grupo COL+G+E. Las dietas COL+G+A1 y COL+G+A2 presentaron menor contenido de GSH ( $p < 0,05$ ) que los animales del grupo COL+G. Estos resultados sugieren que el aumento del contenido lipídico en la dieta induciría un aumento en el contenido hepático de GSH, el cuál sería revertido cuando en la dieta se incorpora aislado proteico de amaranto. Este efecto ocurriría tanto en la

administración por un período más largo (4 semanas) y en simultáneo con el alto contenido graso de aislado (7,6 % p/p en la dieta) como al administrar 15,2 % p/p durante 1 semana y posteriormente a un período de dieta alta en grasa.

#### 5.D. Evaluación del efecto de las dietas sobre parámetros del colon

En este punto cabe hacer una breve comparación entre el intestino de los roedores y el de los humanos, los cuales presentan algunas diferencias importantes. El intestino murino presenta una proporción mucho menor de intestino delgado que el humano, mientras que el colon y el ciego son mucho más expandidos, lo que permite un mayor aprovechamiento de nutrientes no digeribles. Las vellosidades intestinales en roedores son más largas que en el humano, generando un incremento de área superficial en el intestino delgado, como un mecanismo de compensación por la falta de pliegues de la mucosa. El colon murino es más liso, sin divisiones, mientras que el humano está sub-compartmentalizado en “bolsillos”. Desde el punto de vista microscópico, el colon murino está compuesto por una *muscularis mucosae* delgada sin una submucosa diferenciable, mientras que el colon humano está cubierto por una pared mucosa con mayor espesor. A nivel celular, existe una diferente distribución de algunos tipos celulares, como por ejemplo las células de globet productoras de mucina y las células epiteliales de Paneth (Nguyen y col., 2015). En este estudio, se utilizaron las paredes de colon y ciego de las ratas para obtener los homogenatos sobre los que se realizaron las determinaciones.

##### 5.D.1. Especies reactivas al oxígeno (ROS)

Con el objetivo de evaluar un efecto antioxidante que podría ser directo o indirecto del aislado proteico de amaranto, se determinó el contenido de ROS en las células de la pared intestinal de las ratas, realizando la determinación sobre los homogenatos preparadas a partir de las mismas. En la **Figura 5.14** se muestran los resultados obtenidos para los distintos grupos evaluados.

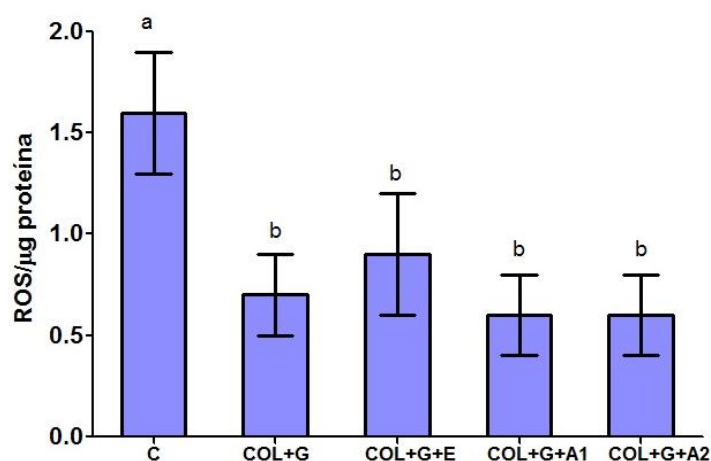




Figura 5.14. ROS en homogenatos de colon de grupos de animales (6) alimentados con diferentes dietas. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

La evaluación del contenido de ROS en los homogenatos de colon arrojó, contrario a lo inicialmente esperado, un valor menor ( $p < 0,05$ ) en animales alimentados con la dieta COL+G respecto al grupo C. La incorporación de vitamina E o de aislado de amaranto no produjo ningún cambio significativo ( $p > 0,05$ ) respecto al grupo COL+G.

#### 5.D.2. Actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD).

Los resultados de la determinación de la actividad de la enzima SOD, realizada a partir de un kit comercial, se muestra en la Figura 5.15. Como puede observarse, los homogenatos de pared intestinal de los distintos grupos de animales no mostraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en ninguno de los casos.

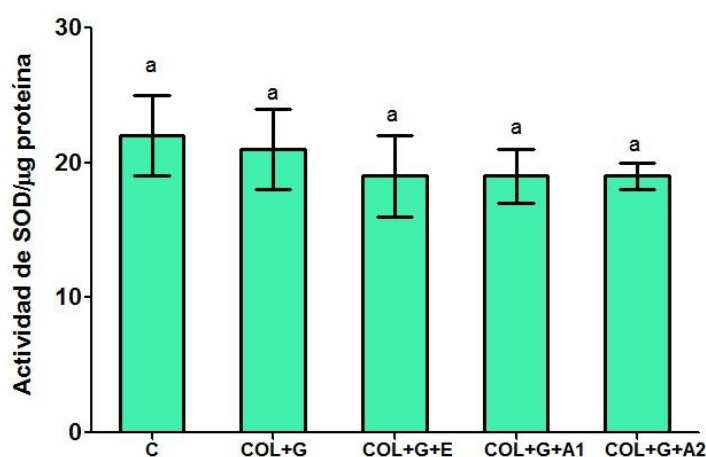


Figura 5.15. Actividad SOD en homogenatos de colon de grupos de animales (6) alimentados con diferentes dietas. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

#### 5.D.3. Actividad de la enzima GPx.

En la Figura 5.16 se muestran los resultados obtenidos para la determinación de la actividad de la enzima glutatión peroxidasa en los homogenatos de pared intestinal.

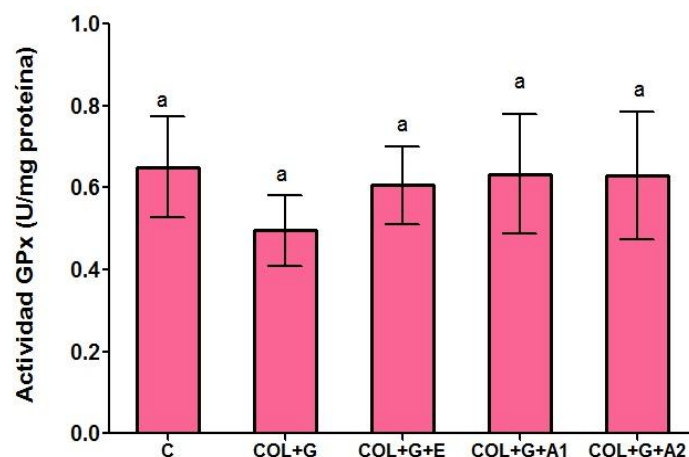


Figura 5.16. Actividad GPx en homogenatos de colon de grupos de animales (6) alimentados con diferentes dietas. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Como se puede observar, no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en la actividad de esta enzima entre los grupos C, COL+G y COL+E. Tampoco la incorporación del aislado a la dieta generó ningún efecto detectable sobre la actividad de esta enzima ( $p > 0,05$ ).

#### 5.D.4. Contenido de GSH

La determinación del contenido de GSH en los homogenatos de colon también se realizó a partir de la utilización del correspondiente kit comercial tal como se explicó en la sección de Materiales y Métodos. En la **Figura 5.17** se muestran los valores de GSH obtenidos.

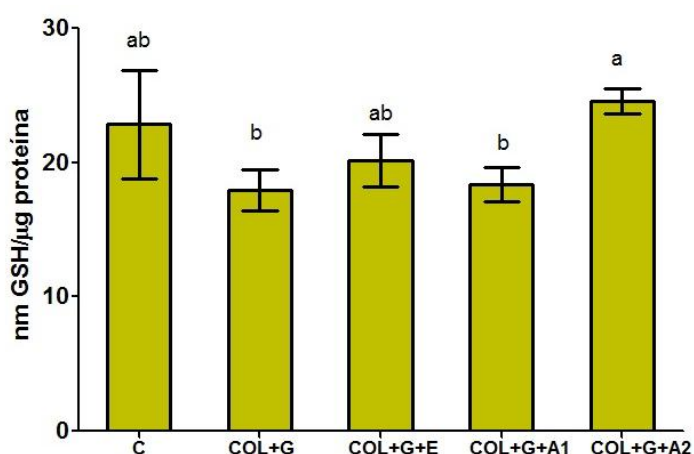


Figura 5.17. Contenido de GSH en homogenatos de colon de grupos de animales (6) alimentados con diferentes dietas. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

El contenido de GSH intestinal no presentó diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre el grupo alimentado con la dieta COL+G y el grupo alimentado con la dieta base (C). Por lo tanto, el alto contenido lipídico de la dieta no indujo cambios en este parámetro. Tampoco se observó un

cambio significativo ( $p > 0,05$ ) cuando las dietas fueron adicionadas con vitamina E (COL+G+E), o cuando se agregó aislado de amaranto y se administró de manera “crónica”. Sin embargo, los animales alimentados con la dieta COL+G+A2 presentaron un valor significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) de GSH respecto a la dieta COL+G.

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En un trabajo previo realizado en nuestro laboratorio, se evaluó el efecto antioxidante de aislado proteico de amaranto adicionado a dietas administradas a ratas Wistar (Lado y col., 2015), pero el diseño experimental presentaba varias diferencias con respecto al realizado en este trabajo. En primer lugar, se había adicionado a las dietas colesterol 1 % p/p a fin de inducir el estrés oxidativo. Por otra parte, la proporción de aislado proteico de amaranto fue menor (2,5 % p/p que correspondió a un 10 % de reemplazo de la proteína total de la dieta), y fue adicionado tanto a dietas con y sin agregado de colesterol. Los tiempos de administración de las dietas fueron similares a los del presente trabajo. Se ha demostrado en otros estudios, que las dietas ricas en colesterol provocan un aumento de la peroxidación de lípidos (Wang y co., 2008); en los casos de hipercolesterolemia, el contenido de colesterol de eritrocitos, plaquetas, leucocitos polimorfonucleares y células endoteliales aumenta, lo que causa un aumento de la producción de ROS (Kok y col., 1991; Prasad y Kalra, 1989 Sudhahar y col., 2006, ). Sin embargo, en las condiciones experimentales que se aplicaron en el trabajo previo, el colesterol adicionado no produjo un cambio significativo en los parámetros relacionados con el estrés oxidativo (TBARS en plasma e hígado, actividad SOD en plasma). Aun así, la presencia de colesterol en la dieta puso en evidencia ciertos efectos dados por la adición de aislado de amaranto, tales como una mayor capacidad reductora (FRAP) y una disminución de TBARS y de la actividad SOD en plasma, y una disminución de TBARS en hígado; estas cambios no fueron registrados cuando las dietas fueron adicionadas con aislado pero sin colesterol (Lado y col., 2015). En función de estos primeros resultados *in vivo*, se decidió modificar el diseño experimental y además ampliar los parámetros y los tejidos evaluados, incorporando el análisis de la pared intestinal. Dado que se ha demostrado que una dieta alta en grasa aumenta el estrés oxidativo en una variedad de tejidos, con los efectos secundarios asociados, las dietas con alto contenido de grasa (HFD) se utilizan comúnmente en los modelos animales para inducir el estrés oxidativo, como se describió en la introducción de este capítulo. Por ejemplo, una dieta HDF conteniendo 20 % de aceite de coco, 2 % de colesterol y 0,125 % de sales biliares y administrada durante 10 semanas a ratas Wistar elevó significativamente los niveles de TBARS y dienos conjugados y disminuyó las actividades SOD, CAT, GPx, GST y el contenido de GSH en hígado, corazón, riñón, intestino y aorta (Vijayakumar y Nalini, 2004). En otro trabajo, la administración de una dieta HDF conteniendo 25,5 % de aceite de maíz y 20,5 % de grasa de vaca indujo estrés oxidativo en tejidos hepático, cardíaco y renal caracterizado por reducción de las actividades de enzimas antioxidantes y de GSH e incremento de MDA y carbonilos proteicos en la mayoría de los tejidos (Noeman y col., 2011). En base a esto, se modificó la forma de inducción del estrés oxidativo, formulando una dieta con alto contenido de grasa (HFD) a través de la adición de grasa porcina (10 % p/p) y colesterol (2 % p/p). Además del aumento en el contenido de lípidos, también se modificó el perfil de ácidos grasos de la fase

grasa. En una evaluación del perfil de ácidos grasos realizada por otro integrante de nuestro laboratorio se determinó que la fase grasa de la dieta base (basada en aceite de soja) contenía un 62,5 % de PUFAS (ácido linoleico y  $\alpha$ -linolénico), un 22,5 % de monoinsaturados (ácido oleico) y un 15 % de ácidos grasos saturados (mayoritariamente ácido palmítico), mientras que la fase grasa de la dieta COL+G contenía casi 12 % de PUFAS (mayoritariamente ácido linoleico y  $\alpha$ -linolénico), casi 35 % de monoinsaturados (mayoritariamente ácido oleico y algo de palmitoleico) y casi 45 % de ácidos grasos saturados (ácidos palmítico, esteárico y mirístico) provenientes de la grasa porcina, además del colesterol también adicionado.

Una parte de la actividad metabólica del hígado es mediada por la vía de transformación de xenobióticos, en la que participa el citocromo P450, vía que puede generar ROS. Este órgano presenta también una gran actividad macrofágica, durante la cual se activan las células de Küpfer y se produce una respuesta respiratoria que genera ROS. La ocurrencia de estas reacciones explica por qué en el hígado se lleva a cabo la formación de especies reactivas a alta velocidad. Entre las especies reactivas que se producen en este órgano se encuentran radicales libres, peróxidos, como el peróxido de hidrógeno e hidroperóxidos de distintas biomoléculas; aniones, como el peroxinitrito y el hipoclorito, producido por células fagocíticas y otras especies que tienen un gran potencial pro-oxidativo. El hígado combate este potencial pro-oxidativo a través de distintos mecanismos de defensa antioxidante, como enzimas y atrapadores de radicales libres. Para que el sistema de defensa sea efectivo es indispensable que el metabolismo intermediario del hígado funcione adecuadamente para proveer la energía química, el poder reductor y los precursores de biomoléculas necesarios tanto para reparar los compuestos oxidados (fosfolípidos, ácidos grasos insaturados de las membranas, bases nitrogenadas del ADN, entre otros) como para reponer moléculas que no se pueden reparar (por ejemplo proteínas oxidadas). Cuando este sistema metabólico defensivo funciona de manera coordinada y recibe un aporte adecuado de combustibles metabólicos y componentes dietéticos esenciales (aminoácidos, ácidos grasos poliinsaturados, vitaminas y elementos trazas), la célula hepática puede mantener un bajo nivel de especies reactivas. Así el hígado funciona en un estado en el que la velocidad de formación de especies reactivas está compensada por una velocidad similar de consumo a través de los mecanismos antioxidantes (Videla, 2002). La citotoxicidad del colesterol libre está bien establecida. Un estudio reciente ha demostrado que un importante mecanismo de lesión hepática mediada por el consumo de colesterol es la sensibilización de las mitocondrias del hepatocito, provocando un agotamiento en el funcionamiento del glutatión mitocondrial (GSHm) (Mari, 2006). Según Subramanian y col. (2011), la apoptosis producida en los hígados de ratones aumenta con el colesterol presente en la dieta, al igual que los ácidos grasos libres circulantes, lo que puede desencadenar una respuesta pro-inflamatoria e inducir lipoapoptosis. Por su parte, estudios llevados a cabo por Tsai (1975) muestran que ratas Sprague-Dawley alimentadas con una dieta suplementada con colesterol, durante 12 semanas, presentan una mayor tasa de peroxidación de lípidos en el hígado, en términos de sustancias reactivas al TBA (60% de incremento) y contenido

de dienos conjugados (incremento mayor a 4 veces). Este mismo autor también demostró que la tasa de peroxidación de lípidos en el hígado de las ratas aumentaba con la duración de la ingesta. En un estudio realizado por Anila y Vijayalakshmi (2003) se demostró que en ratas albinas alimentadas durante 3 meses con una dieta que contiene colesterol (2 % p/p) se generaron aumentos significativos de los niveles de MDA, hidroperóxidos y dienos conjugados en el hígado, corazón y riñones de los animales respecto del grupo control. En dicho estudio, también se registró una disminución significativa de la actividad enzimática SOD en los mencionados órganos. En otro estudio, se alimentaron ratas Wistar con dietas conteniendo colesterol (1 % p/p) durante 16 semanas, observándose también un aumento en los valores de TBA en hígado; pero en este caso, a diferencia del estudio anterior, la actividad SOD se incrementó en este órgano con el consumo del colesterol, lo cual es explicado como un proceso de adaptación para hacer frente a la producción de radicales libres (Belguith-Hadriche y col., 2012).

Frente a las condiciones dietarias elegidas (dieta COL+G) y la administración durante 4 semanas, el aumento del contenido y cambio en el tipo de grasa produjeron solo algunas modificaciones respecto a la dieta base (C). En el plasma de las ratas, la dieta COL+G produjo una disminución de las TBARS (sin cambios en FRAP, SOD y GSH), mientras que en el hígado indujo un aumento del GSH (sin cambio en TBARS, SOD y GPx).

*En función de estos resultados podemos decir que esta dieta con grasa aumentada tampoco fue capaz de inducir un estado de estrés oxidativo evidente. Por el contrario, en el plasma se registró una menor presencia de productos secundarios de la oxidación lipídica, lo cual podría estar relacionado con el tipo de ácidos grasos en la grasa porcina y/o con la presencia de algún antioxidante presente en la misma. Sin embargo, el aumento del contenido de GSH en el hígado da el indicio de la aparición de ROS en este órgano, las cuales inducirían una respuesta celular de defensa. La combinación de contenido y tipo de grasa y el tiempo de administración utilizada en este trabajo no fueron suficientes para inducir un estado de estrés oxidativo pleno, el cual probablemente podría alcanzarse con una administración más prolongada.*

Se encuentran en la literatura una diversidad de estudios del efecto a nivel plasmático *in vivo* de compuestos potencialmente antioxidantes. Ko y col. (2014) estudiaron la actividad antioxidante *in vivo* de polifenoles de espinaca en ratas alimentadas con una dieta alta en colesterol y grasa durante 6 semanas. Los animales alimentados con la HDF mostraron hiperlipidemia y estrés oxidativo (aumento en la concentración de dienos conjugados en plasma); si bien los polifenoles demostraron un efecto antioxidante en parámetros de oxidación lipídica hígado así como sobre la actividad de SOD en este órgano, este efecto no fue significativo en cuanto los dienos conjugados en plasma. Awad y col. (2016) demostraron el efecto de un concentrado de proteína de leche (MPC) y su hidrolizado como antioxidantes en ratas en las que el estrés oxidativo se indujo con alloxan. Los resultados indicaron que el tratamiento con alloxan aumentó los niveles de TBARS y

disminuyó la actividad SOD en plasma, sin cambios en el nivel de GSH. La ingestión de ambas muestras proteicas produjo una disminución de las TBARS y aumento de SOD en ausencia de alloxan, y aumento de GSH en presencia y ausencia de alloxan.

Wang y col. (2007) han llevado a cabo estudios *in vivo* con péptidos antioxidantes, utilizando ratas Wistar alimentadas con “douchi”, un alimento de soja fermentada. Los resultados obtenidos mostraron que las isoflavonas y péptidos presentes en la dieta actuaron como agentes antioxidantes. Se comprobó un aumento significativo de actividad SOD (incremento del 70%) y un valor mínimo de compuestos reactivos al TBA en el hígado de los animales alimentados con “douchi”. De acuerdo a las micrografías electrónicas obtenidas se llegó a la conclusión que los compuestos presentes en los extractos de “douchi” influyeron en la progresión de la lipidosis de los hepatocitos, los cuales sufrieron una menor degeneración que los correspondientes a las ratas alimentadas con otras dietas. Algo similar observaron en la estructura de las mitocondrias, la cual se mantuvo intacta en el grupo de control positivo (animales alimentados con dietas conteniendo vitamina E), sufrió cambios mínimos en los animales del grupo alimentados con extractos de “douchi” y presentó anomalías notables e hinchamiento en las ratas que consumieron una dieta base (control negativo). En este último grupo también se evidenció ruptura en la membrana nuclear de los hepatocitos. En otro estudio (Nazeer y col., 2012), ratas Wistar fueron alimentadas con pellets adicionados con un péptido con demostrada actividad antioxidante *in vitro* aislado de músculo de corvina. Los experimentos *in vivo* mostraron una disminución de la actividad de la enzima SOD en los animales a los cuales se les estimuló el estrés oxidativo por el agregado de etanol en la dieta (control negativo). El grupo alimentado con el péptido de origen marino, demostró un aumento de la actividad enzimática respecto al control negativo. Mediante microscopía se observaron daños a nivel de tejidos de los animales estimulados con etanol, como degeneración celular, congestión o necrosis. En los grupos alimentados con el péptido antioxidante y etanol se visualizaron solo algunas degeneraciones leves en los tejidos hepático y renal. El péptido de origen marino, compuesto por cisteína, fenilalanina, glicina e histidina, aminoácidos conocidos por ejercer actividad antioxidante, también presentó propiedades hidrófobas. Pudo ser absorbido por los animales manteniendo los niveles de enzimas antioxidantes y neutralizando el estrés oxidativo inducido por el consumo de etanol. En el trabajo de Awad y col. (2016) previamente mencionado (efecto de concentrado e hidrolizado de proteína de leche, inducción oxidativa con alloxan) se registró en hígado disminución de TBARS y aumento de GPx por el consumo de ambas muestras, disminución de SOD y aumento de GSH por consumo del hidrolizado proteico.

*Si bien la dieta HDF no logró en nuestro caso inducir un estado de estrés oxidativo, igualmente fue posible registrar algunas modificaciones en parámetros relacionados con la actividad antioxidante cuando las dietas fueron adicionadas con aislado proteico de amaranto en dos dosis y dos formas de administración distintas. En primer lugar, cuando la administración fue “crónica” (grupo*

COL+G+A1), esto es durante 4 semanas, y en la menor dosis (3,6 % p/p, 25 % de reemplazo de la proteína total) se evidenció un aumento de la capacidad reductora total del plasma (FRAP) y un descenso del GSH en hígado respecto al grupo COL+G. En el otro caso, cuando la administración fue “aguda”, esto es durante 1 semana con una mayor dosis de aislado (7,2 % p/p, 50 % de reemplazo de la proteína total) y luego de un consumo de 4 semanas de la dieta rica en grasa, se observaron algunos efectos adicionales: aumento del parámetro FRAP (similar al anterior), disminución de GSH (similar al anterior) y aumento de GPx en hígado.

*Estos resultados sugieren que luego de sufrir la digestión gastrointestinal, al menos algunos productos de la digestión fueron capaces de atravesar la pared intestinal y alcanzar el interior del organismo para finalmente producir las modificaciones descriptas. El aumento del parámetro FRAP podría estar dado por compuestos hidrosolubles derivados del amaranto que se encuentren en la circulación o por algún efecto más indirecto que no puede comprobarse con los resultados actuales.*

El tracto gastrointestinal es una fuente de ROS producidas por las células epiteliales. También, se encuentra expuesto a las ROS presentes en los alimentos y a aquellas generadas por reacciones químicas de componentes dietarios en el estómago. Por lo tanto, el intestino está altamente expuesto a estrés oxidativo causada por desbalance entre las ROS y los sistemas con capacidad para detoxificar los intermediarios reactivos o de reparar el daño producido (Pinent y col., 2016). A fin de preservar su integridad celular y la homeostasis tisular, el intestino cuenta con varios mecanismos de defensa tales como la capacidad de mantener altas concentraciones de antioxidantes tales como glutatión, tocoferol y ácido ascórbico, de aumentar la expresión de enzimas antioxidantes (glutatión peroxidasa GPx, glutatión reductasa GR, superóxido dismutasa SOD, catalasa CAT), y de inducir la muerte celular por apoptosis de los enterocitos dañados (Aw, 1999). En la literatura se encuentra ampliamente documentado el rol del estrés oxidativo y las rutas de señalamiento inducidas por estrés oxidativo en la etiología de enfermedades como la colitis ulcerosa, la enfermedad de Crohn y la colitis asociada al cáncer colorrectal (Piechota-Polanczyk y Fichna, 2014). Si bien hay un gran volumen de literatura donde se estudia el efecto antioxidante de diversas sustancias sobre células intestinales en cultivo (como se discutió en el Capítulo 3), no se encuentra tanta bibliografía sobre estudios *in vivo* de efecto antioxidante sobre intestino. Un péptido derivado de kiwi (kissper) demostró ser efectivo para prevenir el incremento de calcio y ROS, así como de mediadores inflamatorios, inducidos por lipopolisacárido tanto en células Caco-2 como células obtenidas de la mucosa colónica de pacientes con enfermedad de Crohn (Ciacci y col., 2013). La suplementación con taurina (un producto derivado de la cisteína) en la dieta de un modelo murino de colitis inducida por TNBS redujo la actividad mieloperoxidasa y disminuyó la generación inducida de ROS en tejido de colon, sugiriendo que este aminoácido restablece la defensa antioxidante del colon (Son y col., 1998).



En nuestro caso, se registró en el intestino un descenso en el contenido de ROS intracelulares cuando los animales fueron alimentados con la dieta HFD (COL+G) respecto a la dieta control (C).

*La dieta con mayor contenido graso tampoco pudo inducir un estado de estrés oxidativo en la pared intestinal, sino que el cambio fue contrario al esperado. Cuando se adicionó aislado de amaranto a la dieta y la administración fue “crónica” (grupo COL+G+A1), esto es durante 4 semanas, y en la menor dosis (3,6 % p/p, 25 % de reemplazo de la proteína total) no se registraron modificaciones en los parámetros evaluados en colon. Sin embargo, en el caso de administración de la dieta COL+G+A2 se evidenció un aumento del GSH en la pared intestinal. Las acciones sobre la pared intestinal podrían ser provocadas en principio por la totalidad de los productos de digestión gastrointestinal del aislado proteico de amaranto, ya sea aquellos capaces de ingresar a las células intestinales, como aquellos que pueden interaccionar con las membranas plasmáticas y generar alguna modificación en el interior celular o aquellos que se encuentran en la luz intestinal y pueden actuar directamente sobre las ROS presentes.*

## **CONCLUSIONES GENERALES**

El objetivo principal planteado para este trabajo fue profundizar el conocimiento previamente desarrollado en nuestro grupo de trabajo sobre la capacidad antioxidante del aislado proteico de amaranto. Dado que varios ensayos *in vitro* (acelulares) realizados posicionaban a esta semilla como una fuente potencial de péptidos bioactivos antioxidantes, se decidió avanzar a estudios en sistemas más complejos pero también con mayor aproximación al sistema real (o sea el organismo vivo) evaluando la actividad *in vitro* usando cultivos celulares y la actividad *ex vivo* sobre la oxidación de las LDL humanas. Además, se realizó un estudio con ratas Wistar con el objetivo de evaluar parámetros que permitan conocer lo que ocurre realmente *in vivo*.

Se comparó el digerido de aislado proteico de amaranto obtenido por la aplicación del protocolo de digestión gastrointestinal simulada de nuestro laboratorio con un método que tiene consenso internacional; también se obtuvieron (por separación de acuerdo a su masa molecular) y compararon las fracciones de los aislados digeridos por los distintos métodos. Los resultados arrojaron importantes similitudes entre los aislados digeridos y sus correspondientes fracciones (grado de hidrólisis, composición y actividad antioxidante en sistemas químicos *in vitro*) lo que permitió validar nuestro proceso de digestión simulada frente al protocolo consensuado internacionalmente. El digerido de aislado proteico de amaranto obtenido a partir del protocolo de simulación gastrointestinal del laboratorio, sus fracciones separadas y péptidos derivados del mismo previamente identificados fueron utilizados para ensayos *in vitro/ex vivo*.

Se realizaron estudios *in silico* donde se evaluaron características fisicoquímicas, de estructuras y de interacción con células de los diez péptidos derivados del digerido gastrointestinal de aislado proteico de amaranto que sirvieron de base para acercarnos al análisis de posibles mecanismos de acción.

Se logró demostrar que el digerido de aislado proteico de amaranto fue capaz de retardar el inicio y disminuir la velocidad de propagación de la oxidación de LDL inducida por  $\text{Cu}^{+2}/\text{H}_2\text{O}_2$ , mientras que sus fracciones más activas lograron en algunos casos una inhibición completa de la oxidación. Estas fracciones más activas están compuestas por moléculas tanto con carácter hidrofílico como hidrofóbico. Algunos de los péptidos sintéticos también demostraron una alta actividad (incluso inhibición completa) de la oxidación de las LDL. Los mismos son péptidos catiónicos o neutros, con presencia de

histidina, lisina, residuos aromáticos y/o residuos hidrofóbicos. No se encontró una correlación entre la actividad frente a las LDL y la actividad en sistemas de inhibición de radicales libres en solución (ORAC y HORAC).

Los ensayos de actividad antioxidante intracelular en cultivos de células Caco-2 TC7 permitieron concluir que todas las muestras tuvieron un efecto en la disminución del contenido de ROS intracelulares, mientras que tuvieron efectos variados sobre la actividad de las enzimas antioxidantes y la oxidación de lípidos celulares. Una cuestión interesante que abrió un abanico sobre posibles mecanismos de acción es el hecho de que algunos péptidos sintéticos mostraron una falta de correlación entre los ensayos acelulares y celulares de neutralización de ROS lo que se podría deber a modificaciones sufridas por los péptidos cuando están en contacto con las células o a que estén ejerciendo su efecto por mecanismos distintos a la neutralización directa de las ROS.

Se evaluó si estas muestras (productos de la digestión gastrointestinal simulada) sufrirían modificaciones al entrar en contacto con las células intestinales y si son efectivamente capaces de atravesar la barrera intestinal y absorberse. Para esto se realizaron ensayos de absorción en monocapas de células Caco-2 TC7. En función de los resultados obtenidos pudieron detectarse:

- ciertas fracciones y péptidos que fueron degradadas en baja proporción por las peptidasas extracelulares y que fueron absorbidas en proporción importante, y por lo tanto, tienen la potencialidad de ejercer una acción en el interior del organismo. Este es el caso de la fracción 28 separada del digerido gastrointestinal (correspondiente a péptidos con masas moleculares cercanos a 600 Da, esto es alrededor de 5 aminoácidos), y del péptido P3 (GDRFQDQHQ, 1129 Da), que además presentaron buenas actividades frente a la oxidación de las LDL, por lo que se presentan como potenciales agentes para la prevención de patologías cardiovasculares relacionadas con este proceso. Será necesario evaluar aspectos relacionados con la resistencia a la degradación de estos péptidos a nivel del hígado y la circulación sanguínea así como de dosificación.
- varias fracciones y péptidos que fueron poco degradados por peptidasas del borde en cepillo y que demostraron algún efecto relacionado con el estado antioxidante intracelular, y por lo tanto podrían ejercer efectos beneficiosos en el control del balance redox de las células intestinal y con ello en la prevención de ciertas patologías intestinales, actuando

tanto a nivel de la luz intestinal (F28, F34, P8, P5, P2 y P1) y/o a nivel intracelular (F28, F34, P2, P3, P4, P5, P6, y P10).

- En muchos de los casos se registró la aparición de nuevos productos por hidrólisis por las peptidasas del borde en cepillo, los cuales también en muchos casos fueron absorbidos en distintas proporciones. Por lo tanto, se plantea la necesidad de realizar nuevos estudios a fin de evaluar la importancia fisiológica de estos nuevos péptidos.

Cabe aclarar que en este trabajo solo se evaluó la absorción de algunas fracciones separadas del digerido y no se puede descartar que otras presenten características interesantes.

Finalmente, se realizó un ensayo *in vivo* a través de la incorporación de aislado de amaranto en las dietas de ratas Wistar. En este caso se pudieron demostrar algunos efectos en los biomarcadores del estrés oxidativo en plasma, hígado y colon; la administración de aislado de amaranto de manera “aguda” (menor tiempo y mayor concentración de aislado luego de un período de “inducción de estrés”) mostró algunos efectos más que la administración durante un mayor tiempo, menor concentración y en simultáneo con la “inducción”. Cabe remarcar que estos efectos del amaranto fueron evidenciados sin haber logrado inducir efectivamente un estado de estrés oxidativo en los animales. Se abre la necesidad de buscar una manera de inducir un franco estrés oxidativo para evaluar el efecto de las proteínas de amaranto en estas condiciones.

*Todos los resultados obtenidos en esta Tesis permiten sumar evidencia científica que reafirma que el aislado proteico de amaranto es fuente de péptidos bioactivos antioxidantes. Además de algunos aspectos pendientes previamente mencionados que ayudarían a terminar de dilucidar los mecanismos de acción y a lograr una certeza mayor respecto a los efectos en el organismo, es necesario desarrollar una formulación que contenga al aislado de amaranto como ingrediente y evaluar efectos de la matriz y procesamiento sobre la biodisponibilidad y bioactividad de los péptidos para finalmente lograr la formulación de un alimento funcional antioxidante. Otra posible derivación de los resultados de este trabajo, es el desarrollo de matrices o vehículos conteniendo alguno/s de los péptidos, desarrollados para lograr una acción en un sitio específico.*

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Abdel-Aal, E. S. M. (2008). Effects of baking on protein digestibility of organic spelt products determined by two in vitro digestion methods. *LWT - Food Science and Technology*, 41(7), 1282–1288.
- Abugoch, L. E, Martínez E. N. & Añón, M. C. (2003). Influence of the extracting solvent upon the structural properties of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) glutelin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 4060-4065
- Adachi, M., Kanamori, J., Masuda, T., Yagasaki, K., Kitamura, K., Mikami, B. & Utsumi, S. (2003) Crystal structure of soybean 11S globulin: glycinin A3B4 homohexamer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100 (72): 7395-7400.
- Adachi, M., Takenaka, Y., Gidamis, A. B., Mikami, B. & Utsumi, S. (2001) Crystal structure of soybean proglycinin A1aB1b homotrimer. *Journal of Molecular Biology*, 305: 291-305.
- Adler, G. (1997). Regulation of human pancreatic secretion. *Digestion*, 58 (1), 39–41.
- Adler-Nissen J. (1979) Determination of degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *J. Agric. Food Chem.*; 12: 605-623.
- Aiello, G., Ferruzza, S., Ranaldi, G., Sambuy, Y., Arnoldi, A., Vistoli, G., & Lammi, C. (2018). Behavior of three hypocholesterolemic peptides from soy protein in an intestinal model based on differentiated Caco-2 cell. *Journal of Functional Foods*, 45(April), 363–370.
- Alam, M. A., Al-jenoobi, F. I., & Al-mohizea, A. M. (2012). Everted gut sac model as a tool in pharmaceutical research : limitations and applications. *Journal of Pharmacy And Pharmacology*, 64, 326–336..
- Almasaudi, S. B., El-Shitany, N. A., Abbas, A. T., Abdel-dayem, U. A., Ali, S. S., Al Jaouni, S. K., & Harakeh, S. (2015). Antioxidant, Anti-inflammatory, and Antiulcer Potential of Manuka Honey against Gastric Ulcer in Rats. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 1–10.
- Alqahtani, S., Mohamed, L. A., & Kaddoumi, A. (2013). Experimental models for predicting drug absorption and metabolism. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 9(10), 1241–1254.
- Aluko, R. E. (2012). *Functional foods and nutraceuticals* (pp. 37–61). New York, NY: Springer Science+Business Media LLC.
- Anderson, E. J., Katunga, L. A., & Willis, M. S. (2013). Mitochondria as a Source and Target of Lipid Peroxidation Products in Healthy and Diseased Heart. *Clin Exp Pharmacol Physiol.*, 39(2).
- Anila, L & Vijayalakshmi, Narayana. (2003). Antioxidant action of flavonoids from *Mangifera indica* and *Embllica officialis* in hypercholesteromic rats. *Food Chemistry*. 83. 569-574. 10.1016/S0308-8146(03)00155-9.
- Antunes, F., Andrade, F., Ferreira, D., Nielsen, H. M., & Sarmiento, B. (2011). Models to Predict Intestinal Absorption of Therapeutic Peptides and Proteins Models to Predict Intestinal Absorption of Therapeutic Peptides and Proteins, (May 2014).
- Aphalo, P., Castellani, O. F., Martínez, E. N. & Añón, M. C. (2004). Surface Physicochemical Properties of Globulin - P Amaranth Protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 616-622.
- Aranda, José Francisco.2018. Tesis de doctorado. Estudio, desarrollo y aplicación de modelos de la teoría QSPR-QSAR en pesticidas. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad nacional de La Plata.

- Artursson, P. (1990). Epithelial Transport of Drugs in Cell Culture. I: A Model for Studying the Passive Diffusion of Drugs over Intestinal Absorptive (Caco-2) Cells. *Journal of Pharmaceutical Science*, 79(6), 45–54.
- Ashok Kumar, B. S., Lakshman, K., Jayaveea, K. N., Sheshadri Shekar, D., Saleemulla Khan, Thippeswamy, B. S., & Veerapur, V. P. (2012). Antidiabetic, antihyperlipidemic and antioxidant activities of methanolic extract of *Amaranthus viridis* Linn in alloxan induced diabetic rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 64(1–2), 75–79.
- Aw, T. (1999). Molecular and cellular responses to oxidative stress and changes in oxidation-reduction imbalance in the intestine. *Am. J. Clin. Nutr.* 70, 557–565.
- Awad, S., El-Sayed, M. I., Wahba, A., El Attar, A., Yousef, M. I., & Zedan, M. (2016). Antioxidant activity of milk protein hydrolysate in alloxan-induced diabetic rats. *Journal of Dairy Science*, 99(11), 8499–8510.
- Bagag, A., Jault, M., Sidahmed-Adrar, N., Réfrégiers, M., Giuliani, A., Le Naour, F. (2013). Characterization of Hydrophobic Peptides in the Presence of Detergent by Photoionization Mass Spectrometry. *PLoS ONE* 8(11): e79033.
- Bagchi D (ed). (2008). *Neutraceutical and Functional Food Regulations*. Elsevier: New York.
- Banerjee, A., Kunwar, A., Mishra, B., & Priyadarsini, K. I. (2008). Chemico-Biological Interactions Concentration dependent antioxidant / pro-oxidant activity of curcumin Studies from AAPH induced hemolysis of RBCs, 174,134139.
- Bao, D., Wang, J., Pang, X., & Liu, H. (2017). Protective Effect of Quercetin against Oxidative Stress-Induced Cytotoxicity in Rat Pheochromocytoma (PC-12) Cells. *Molecules*, 22,1122
- Barba de la Rosa, A.P, Gueguen, J., Paredes-López, O. & Viroben, G. (1992). Fractionation procedures, electrophoretic characterization and amino acid composition of amaranth seed proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40: 931-936.
- Barja, G. (2005). Relación entre el estrés oxidativo mitocondrial y la velocidad del envejecimiento, 40(4), 243–249.
- Barrio, D.A. & Añón, M.C. (2009). Potencial antitumoral properties of proteins isolated from Amaranth seeds. *European Journal of Nutrition*, 49(2):73-82.
- Becker R., Wheeler E., Lorenz K., Stafford A., Grosjean O., Betschart A., Saunders R. (1981) A compositional study of amaranth grain. *J. Food Sci.*; 46: 1175-1180.
- Belguith-Hadriche, O., Ammar, S., Del Mar Contreras, M., Turki, M., Segura Carretero, A., El Feki, A., (2016). Antihyperlipidemic and antioxidant activities of edible tunisian *Ficus carica* L. fruits in high fat diet-induced hyperlipidemic rats. *Plant Foods Hum. Nutr.* 71, 183–189
- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70–76.
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative Stress and Antioxidant Defense, (January), 9–19.
- Blum, H., Beier, H., Gross, H. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8: 93-99.
- Boisen, S., & Eggum, B. O. (1991). Critical Evaluation of in Vitro Methods for Estimating Digestibility in Simple-Stomach Animals. *Nutrition Research Reviews*, 4(01), 141.



- Bressani R. (1994) Composition and nutritional properties of amaranth. *Amaranth. Biology, chemistry, and technology*. Ed. Paredes-López, O. Boca Raton, Florida: CRC Press; pp. 185-206.
- Bressani, R. & García Vela, L.A. (1990). Protein fractions in Amaranth grain and their chemical characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38: 1205-1209.
- Brigelius-Flohé, R., & Maiorino, M. (2013). Glutathione Peroxidases. *Comprehensive Toxicology: Third Edition*, 10–15(5), 260–276.
- Brunser, Ó. (2013). Estructura del intestino delgado. In *Fisiología digestiva y nutrición* (pp. 1–32).
- Buege, J. A., & Aust, S. D. (1975). Microsomal Lipid Peroxidation. *Methods in Enzymology*, 129, 302–310.
- Buettner, R., Parhofer, K. G., Woenckhaus, M., Wrede, C. E., Kunz-Schughart, L. A., Schölmerich, J., & Bollheimer, L. C. (2006). Defining high-fat-diet rat models: Metabolic and molecular effects of different fat types. *Journal of Molecular Endocrinology*, 36(3), 485–501. Burrell, M. M. (1993). *Methods in Molecular Biology. Enzymes of Molecular Biology*, 16.
- Burton, P. S., Conradi, R. A., Ho, N. F. H., Hilgers, A. R., & Borchardt, R. T. (1996). How structural features influence the biomembrane permeability of peptides. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 85(12), 1336–1340.
- Cadenas, E., Davies, K. J. A., & Adenas, E. N. C. (2000). Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radical Biology & Medicine*, 29(00), 222–230.
- Cantu, D., Schaack, J., & Patel, M. (2009). Oxidative Inactivation of Mitochondrial Aconitase Results in Iron and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Mediated Neurotoxicity in Rat Primary Mesencephalic Cultures, 4(9), 3–11.
- Cao, S. S., & Kaufman, R. J. (2014). Endoplasmic Reticulum Stress and Oxidative Stress in Cell Fate Decision and Human Disease, 21(3), 396–413.
- Caro, I., Boulenc, X., Rousset, M., Meunier, V., Bourrié, M., Julian, B., ... Fabre, G. (1995). Characterisation of a newly isolated Caco-2 clone (TC-7), as a model of transport processes and biotransformation of drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, 116(2), 147–158.
- Castellani O.F. Caracterización estructural y fisicoquímica de la Globulina-P de amaranto. Tesis doctoral. Universidad Nacional de La Plata. 2000.
- Castellani, O. F., Martínez, E. N & Añón, M. C. (1998) "Structural modifications of an Amaranth globulin induced by pH and NaCl." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 4846-485328.
- Chang, Y., Chang, W., Tsai, N., Huang, C., Kung, C., Su, Y. ... Lu, C. (2014). The Roles of Biomarkers of Oxidative Stress and Antioxidant in Alzheimer ' s Disease : A Systematic Review, 2014, 13–16.
- Chang, K., Yang, J. (2013). Analysis and Prediction of Highly Effective Antiviral Peptides Based on Random Forests. *PLoS ONE* 8(8): e70166.
- Charman, William, N., Porter, C. J. H., Mithani, S., & Dressman, J. B. (1997). Physicochemical and physiological mechanisms for the effects of food on drug absorption: The role of lipids and pH. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 86(3), 269–282.
- Chen, J., Cui, C., Zhao, H., Wang, H., Zhao, M., Wang, W., & Dong, K. (2018). The effect of high solid concentrations on enzymatic hydrolysis of soya bean protein isolate and antioxidant activity of the resulting hydrolysates. *International Journal of Food Science & Technology*, 53, 954–961.

- Chen, J., Gaikwad, V., Holmes, M., Murray, B., Povey, M., Wang, Y., & Zhang, Y. (2011). Development of a simple model device for in vitro gastric digestion investigation. *Food and Function*, 2(3–4), 174–182.
- Chen, S. & Paredes López, O. (1997) "Isolation and characterization of the 11S globulin from amaranth seeds." *Journal of Food Biochemistry*, 21: 53-65.
- Ciacci, C., Russo, I., Bucci, C., Iovino, P., Pellegrini, L., Giangrieco, I., Tamburrini, M., Ciardiello, M. (2013). The kiwi fruit peptide kissper displays anti-inflammatory and anti-oxidant effects in in-vitro and ex-vivo human intestinal models. *Clin. Exp. Immun.* 175: 476–484.
- Cid, H., Bunster, M., Canales, M., & Gazitúa, F. (1992). Hydrophobicity and structural classes in proteins. *Protein Engineering, Design and Selection*, 5(5), 373–375.
- Cilla, A., Laparra, J. M., Alegría, A., & Barberá, R. (2011). Mineral and/or milk supplementation of fruit beverages helps in the prevention of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> -induced oxidative stress in Caco-2 cells. *Nutrición Hospitalaria*, 26(3), 614–621.
- Comas-Riu, J., & Rius, N. (2009). Flow cytometry applications in the food industry. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36(8), 999–1011. <https://doi.org/10.1007/s10295-009-0608-x>.
- Comporti, M., Signorini, C., Leoncini, S., Gardi, C., Ciccoli, L., Giardini, A., ... Arezzini, B. (2010). Ethanol-induced oxidative stress: Basic knowledge. *Genes and Nutrition*, 5(2), 101–109.
- Conforti F., Statti G., Loizzo M., Sachetti G. & Poli F. (2005). In vitro antioxidant effect and inhibition of  $\alpha$ -amylase of two varieties of *Amaranthus caudatus* seeds." *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 6: 1098–1102.
- Conradi, R. A., Hilgers, A. R., Ho, N. F. H., & Burton, P. S. (1991). The Influence of Peptide Structure on Transport Across Caco-2 Cells. *Pharmaceutical Research: An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists*.
- Consensus Document (1999). Scientific concepts of functional foods in Europe consensus document. *Br J Nutr* 81, S1–S27.
- Cossio-Bolaños, M., Campos, R. G., Vitoria, R. V., Hochmuller Fogaça, R. T., & de Arruda, M. (2013). Reference curves for assessing the physical growth of male Wistar rats. *Nutrición Hospitalaria*, 28(6), 2151–2156.
- Daugherty, A. L., & Mrsny, R. J. (1999). Transcellular uptake mechanisms of the intestinal epithelial barrier - Part one. *Pharmaceutical Science and Technology Today*, 2(4), 144–151.
- Dávalos, A., Miguel, M., Bartolomé, B. & López Fandiño, R. (2004) "Antioxidant activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis." *Journal of Food Proteins*, 67: 1939-1944.
- De Angelis, I., & Turco, L. (2011). Caco-2 cells as a model for intestinal absorption. *Current Protocols in Toxicology*, (SUPPL.47), 1–15.
- De Baulny, B. O., Le Vern, Y., Kerboeuf, D., & Maisse, G. (1997). Flow Cytometric Evaluation of Mitochondrial Activity and Membrane Integrity in Fresh and Cryopreserved Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Spermatozoa. *Cryobiology*, 34(2), 141–149.
- Deferme, L., Briedé, J. J., Claessen, S. M. H., Cavill, R., & Kleinjans, J. C. S. (2015). Cell line-specific oxidative stress in cellular toxicity: A toxicogenomics-based comparison between liver and colon cell models. *Toxicology in Vitro*, 29(5), 845–855.

- Devlin, Thomas. (2019). Bioquímica: libro de texto con aplicaciones clínicas / coordinada por Thomas M. Devlin. SERBIULA (sistema Librum 2.0).
- Diplock, A. T., Charleux, J. L., Crozier-Willi, G., Kok, F. J., Rice-Evans, C., Roberfroid, M., ... Viña-Ribes, J. (1998). Functional food science and defence against reactive oxidative species. *The British Journal of Nutrition*, 80 Suppl 1, S77-112.
- Dressman, J., Berardi, R. R., Dermentzoglou, L., Russell, T., Schmaltz, S., Barnett, J., & Jarvenpaa, K. (1990). Upper gastrointestinal (GI) pH in young, Healthy men and women. *Pharmaceutical Research*, 7, 757–761.
- Duarte-Correa, A. ; Jokl, L. y Carlsson R. Aminoacid composition of some *Amaranthus* sp. grain proteins and its fractions. *Arch. Latinam.Nutr.* (1986); 26:466-476.
- Egger, L., Ménard, O., Delgado-Andrade, C., Alvito, P., Assunção, R., Balance, S., ... Portmann, R. (2016). The harmonized INFOGEST in vitro digestion method: From knowledge to action. *Food Research International*, 88, 217–225.
- Egusa Saiga, A., & Nishimura, T. (2013). Antioxidative properties of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by a protease treatment in an Fe (II) - induced aqueous lipid peroxidation system. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 77, 2201–2204.
- Ekmekcioglu, C. (2002). A physiological approach for preparing and conducting intestinal bioavailability studies using experimental systems. *Food Chemistry*, 76(2), 225–230.
- Elisia, I., & Kitts, D. D. (2008). Anthocyanins inhibit peroxyl radical-induced apoptosis in Caco-2 cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 312(1–2), 139–145.
- Engelmann, J., Volk, J., Leyhausen, G., & Geurtsen, W. (2005). ROS formation and glutathione levels in human oral fibroblasts exposed to TEGDMA and camphorquinone. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 75(2), 272–276.
- Farvin, K.H.S.; Baron, C.P.; Nielsen, N.S.; Otte, J.; Jacobsen, C. (2010) Antioxidant activity of yoghurt peptides: Part 2—Characterisation of peptide fractions. *Food Chem.* 123, 1090–1097.
- Fasulo, S. V. (2014). Absorción intestinal en mamíferos. Evaluación comparativa de la ruta paracelular en mamíferos terrestres y voladores.
- Fatouros, D. G., & Mullertz, A. (2008). In vitro lipid digestion models in design of drug delivery systems for enhancing oral bioavailability . *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 4(1), 65–76.
- Fernández-checa, J. C., & Kaplowitz, N. (1990). The Use of Monochlorobimane to Determine Hepatic GSH Levels and Synthesis, 219, 212–219.
- Fernández-García, E., Carvajal-Lérda, I., & Pérez-Gálvez, A. (2009). In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. *Nutrition Research*, 29(11), 751–760.
- Fernandez-Pachon, M. S., Berna, G., Otaolaurruchi, E., Troncoso, A. M., Francisco, M., & M. Carmen, G.-P. (2009). Changes in Antioxidant Endogenous Enzymes (Activity and Gene Expression Levels) after Repeated Red Wine Intake. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(15), 6578–6583.
- Fei, V., Kanai, Y., Nussberger, S., Ganapathy, V., Leibach, F., Romero, M. F., Singh, S. K., Boron, W. & Hediger, M. (1994) "Expression cloning of a mammalian proton-coupled oligopeptide transporter." *Nature*, 368:563-566.

- Filman, D. J., Brawn, R. J., Dandliker, W. B., Clinic, S., Jolla, L., & Red, N. (1975). Intracellular supravital stain delocalization as an assay for antibody-dependent complement-mediated cell damage. *Journal of Immunological Methods*, 6, 189–207.
- Finley, John WHintze, K., Jeffery, E. H., Kong, A., Hintze, K. J., Je, E. H., Ji, L. L., & Lei, X. G. (2011). Antioxidants in Foods : State of the Science Important to the Food Industry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (June), 6–11. <https://doi.org/10.1021/jf2013875>
- Fleming ,P., Fitzkee, N., Mezei, M., Srinivisan, R., Rose, G. (2005). A novel method reveals that solvent water favors polyproline II over strand conformation in peptides and unfolded proteins: conditional hydrophobic accessible surface area (CHASA). *Protein Science* , 14, 111–118.
- Fogh, J., & Trempe, G. (1975). *New Human Tumor Cell Lines*. Fogh J. (eds) *Human Tumor Cells in Vitro*. Springer, Boston, MA. Oxford University Press.
- Foltz, M., Cerstiaens, A., van Meensel, A., Mols, R., van der Pijl, P. C., Duchateau, G. S. M. J. E., & Augustijns, P. (2008). The angiotensin converting enzyme inhibitory tripeptides Ile-Pro-Pro and Val-Pro-Pro show increasing permeabilities with increasing physiological relevance of absorption models. *Peptides*, 29(8), 1312–1320.
- Frankel, E. N., & Meyer, A. S. (2000). Review The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants, 1941(March), 1925–1941.
- Fraser, L., Lecewicz, M., & Strzezek, J. (2002). Fluorometric assessments of viability and mitochondrial status of boar spermatozoa following liquid storage. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 5, 85–92.
- Freshney, R. I. (2006). *Basic Principles of Cell Culture*, 3–22.
- Fukushima, D. Structures of plant storage proteins and their functions. *Food Rev.Intl.* (1991); 7 n° 3:353-381.
- Gallego, M., Mora, L., & Toldrá, F. (2018). Characterisation of the antioxidant peptide AEEEEYDDL and its quantification in Spanish dry cured ham. *Food Chemistry*, 258, 8–15.
- Garcia-Nebot J., Maria & Cilla, Antonio & Alegría, Amparo & Barbera, Reyes. (2011). Caseinophosphopeptides exert partial and site-specific cytoprotection against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress in Caco-2 cells. *Food Chemistry - FOOD CHEM.* 129. 1495-1503. [10.1016/j.foodchem.2011.05.129](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.129).
- Georgoulia, P, Glykos, N. (2019). Molecular simulation of peptides coming of age: Accurate prediction of folding, dynamics and structures. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 664 (2019) 76–88
- Gomes, A., Fernandes, E., & Lima, J. L. F. C. (2005). Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 65(2–3), 45–80.
- Gonzalez-Donquiles, C., Alonso-Molero, J., Fernández-Villa, T., Vilorio-Marqués, L., Molina, A. J., & Martín, V. (2017). The NRF2 transcription factor plays a dual role in colorectal cancer: A systematic review. *Plos One*, 12(5), e0177549.
- Gordo-Vidal, F., Calvo-Herranz, E., Abella-Álvarez, A., & Salinas-Gabiña, I. (2010). Toxicidad pulmonar por hiperoxia. *Medicina Intensiva*, 34(2), 134–138.
- Goya, L., Martín, M. Á., Ramos, S., Mateos, R., & Bravo, L. (2009). A Cell Culture Model for the Assessment of the Chemopreventive Potential of A Cell Culture Model for the Assessment of the

Chemopreventive Potential of Dietary Compounds. *Current Nutrition & Food Science*, 5(May 2014), 56–64.

Gorinstein, S., Delgado-Licon, E., Pawelzik, E., Permady, H.H., Weisz, M. & Trakhtenberg, S. (2001) "Characterization of Soluble Amaranth and Soybean Proteins Based on Fluorescence, Hydrophobicity, Electrophoresis, Amino Acid Analysis, Circular Dichroism and Differential Scanning Calorimetry Measurements." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (5): 595 – 601.

Gorinstein, S., Moshe, R., Greene, L. J. & Arruda, P. (1991) "Evaluation of four amaranthus species through protein electrophoretic patterns and their amino acid composition." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39: 951-954.

Gupta, S., Kapoor, P., Chaudhary, K., Gautam, A., Kumar, R., Open Source Drug Discovery Consortium, Raghava, G. (2013). In Silico Approach for Predicting Toxicity of Peptides and Proteins. *PLoS ONE* 8(9): e73957. doi:10.1371/journal.pone.0073957

Guyton, A. C., & Hall, J. E. (1991). *Textbook of medical physiology*. Sciences-New York. <https://doi.org/10.1185/03007995.2011.568059>

Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods on Enzymology*, 186: 1-85.

Halliwell, B. (1990). How to Characterize a Biological. *Free Radical Research Communications*, 9(1), 1–32. <https://doi.org/10.3109/10715769009148569>.

Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (2015). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Fifth Edition. Oxford University Press.

Harman, D., & Ph, D. (1972). *The Biologic Clock : The Mitochondria*.

Hau, J., & Gerald L Van Hoosier, J. R. (2005). *Handbook of Laboratory Animal Science*. Animal Models.

He, R., Ju, X., Yuan, J., Wang, L., Girgih, A. T., & Aluko, R. E. (2012). Antioxidant activities of rapeseed peptides produced by solid state fermentation. *Food Research International*, 49, 432–438.

Hernández-Ledesma, B., Dávalos, A., Bartolomé, B. & Amigo, L. (2005). Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin. Identification of active peptides by HPLC-MS/MS." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 588-593.

Hernandez-Baltazar, D., Zavala-Flores, L. M., & Villanueva-Olivo, A. (2017). El modelo de 6-hidroxidopamina y la fisiopatología parkinsoniana: nuevos hallazgos en un viejo modelo. *Neurología*, 32(8), 533–539.

Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Recio, I., & Bartolomé, B. (2007). ACE-inhibitory and radical-scavenging activity of peptides derived from  $\beta$ -lactoglobulin f(19-25). Interactions with ascorbic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(9), 3392–3397.

Huerta-Ocampo J.A.; León-Galván M.F.; Ortega-Cruz L.B.; Barrera-Pacheco A.; De León Rodríguez A.; Mendoza-Hernández G. y Barba de la Rosa A.P. (2011). *Plant Biol.*, 13 (3): 472-482.

Hur, S. J., Lim, B. O., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2011). In vitro human digestion models for food applications. *Food Chemistry*, 125(1), 1–12.

- Hwang, C. F., Chen, Y. A., Luo, C., & Chiang, W. D. (2016). Antioxidant and antibacterial activities of peptide fractions from flaxseed protein hydrolysed by protease from *Bacillus altitudinis* HK02. *International Journal of Food Science & Technology*, 51, 681–689.
- Ighodaro, O. M., & Akinloye, O. A. (2017). First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*, 54(4), 287–293.
- Intra, J., & Kuo, S.-M. (2007). Physiological levels of tea catechins increase cellular lipid antioxidant activity of vitamin C and vitamin E in human intestinal Caco-2 cells, 71(11), 3831–3840.
- Irshad, M., & Chaudhuri, P. S. (2002). Oxidant-antioxidant system: Role and significance in human body. *Indian Journal of Experimental Biology*, 40(11), 1233–1239.
- Itzkowitz, S. H., & Yio, X. (2004). Inflammation and Cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease : the role of inflammation, 10029.
- Jaroszeski, M. J., & Radcliff, G. (1999). Fundamentals of flow cytometry. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part B Molecular Biotechnology*, 11(1), 37–53.
- Jin, D. X., Liu, X. L., Zheng, X. Q., Wang, X. J., & He, J. - F. (2016). Preparation of antioxidative corn protein hydrolysates, purification and evaluation of three novel corn antioxidant peptides. *Food Chemistry*, 204, 427–436.
- Johnson, L. R. (2002) "Gastrointestinal Physiology." Sixth Edition, St. Louis, Mosby. Elsevier.
- Johnson, L. V, Walsh, M. L., & Chen, L. A. N. B. (1980). Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123. *Cell Biology*, 77(2), 990–994.
- Jomova, K., & Valko, M. (2011). Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*, 283(2–3), 65–87.
- Kaja, S., Payne, A. J., Singh, T., Ghuman, J. K., Sieck, E. G., & City, K. (2016). An optimized lactate dehydrogenase release assay for screening of drug candidates in neuroscience. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 1–6.
- Kanti Das, T., Wati, M. R., & Fatima-Shad, K. (2014). Oxidative Stress Gated by Fenton and Haber Weiss Reactions and Its Association With Alzheimer's Disease. *Archives of Neuroscience*, 2(3).
- Karlsson, J., & Artursson, P. (1991). A method for the determination of cellular permeability coefficients and aqueous boundary layer thickness in monolayers of intestinal epithelial (Caco-2) cells grown in permeable filter chambers. *International Journal of Pharmaceutics*, 71(1–2), 55–64.
- Kedjardune, U., Migasena, P., Changbumrung, S., Pongpaew, P., & Tungtrongchits, R. (1997). Flow rate and composition of whole saliva in children from rural and urban Thailand with different caries prevalence and dietary intake. *Caries Research*, 31, 148–154.
- Kesh, S. B., Sarkar, D., & Manna, K. (2016). High-Fat Diet-Induced Oxidative Stress and Its Impact on Metabolic Syndrome : a Review. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 9(1), 47–52.
- Ketnawa, S., Wickramathilaka, M., & Liceaga, A. M. (2018). Changes on antioxidant activity of microwave - treated protein hydrolysates after simulated gastrointestinal digestion: Purification and identification. *Food Chemistry*, 254, 36–46.
- Kisser, B., Mangelsen, E., Wingolf, C., Partecke, L. I., Heidecke, C. D., Tannergren, C., ... Keiser, M. (2017). The Ussing chamber assay to study drug metabolism and transport in the human intestine. *Current Protocols in Pharmacology*, 2017(June), 7.17.1–7.17.19.

- Kok F, van Poppel G, Melse J, Verheul E, Schouten E, Kruyssen D, Hofman A (1991) Do antioxidants and polyunsaturated fatty acids have a combined association with coronary atherosclerosis? *Atherosclerosis* 86(1):85–90
- Ko, S. H., Park, J. H., Kim, S. Y., Lee, S. W., Chun, S. S., & Park, E. (2014). Antioxidant effects of spinach (*Spinacia oleracea* L.) supplementation in hyperlipidemic rats. *Preventive Nutrition and Food Science*, 19(1), 19–26.
- Kong, F., & Singh, R. P. (2010). A Human Gastric Simulator (HGS) to Study Food Digestion in Human Stomach. *Journal of Food Science*, 75(9).
- Konishi, Y., Fumita, Y., Okuno, K. & Fuwa, H. (1985). Isolation and characterization of globulin from seeds of *amaranthus hypochondriacus*." *Agricultural and Biological Chemistry*, 49, 6-10.
- Konishi, Y., Horikawa, K., Oku, Y., Azumaya, J. & Nakatani N. (1991). Extraction of two albumin fractions from amaranth grains: comparison of some physicochemical properties and the putative localization in the grains. *Agricultural and Biological Chemistry*, 55, 2745-2750.
- Kowaltowski, A. J., Castilho, R. F., & Y, A. E. V. (2001). Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. Elsevier Science B.V. on Behalf of the Federation of European Biochemical Societies, 495, 12–15.
- Kyte, J., & Doolittle, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology*, 157(1), 105–132.
- Lado, M. B., Burini, J., Rinaldi, G., Añón, M. C., & Tironi, V. A. (2015). Effects of the Dietary Addition of Amaranth (*Amaranthus mantegazzianus*) Protein Isolate on Antioxidant Status, Lipid Profiles and Blood Pressure of Rats. *Plant Foods for Human Nutrition*, 70(4), 371–379.
- Laemmli, U. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685.
- Lambeth, J. D. (2007). Nox Enzymes, ROS, and Chronic Disease: An Example of Antagonistic Pleiotropy *J. Free Radic Biol Med.*, 43(3), 332–347.
- Lee, C. Y. (2013). The effect of high-fat diet-induced pathophysiological changes in the gut on obesity: What should be the ideal treatment. *Clinical and Translational Gastroenterology*, 4(7), e39-8.
- Lenzen, S. (2008). The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*, 51(2), 216–226.
- Leong, S. Y., Burritt, D. J., Hocquel, A., Penberthy, A., & Oey, I. (2017). The relationship between the anthocyanin and vitamin C contents of red-fleshed sweet cherries and the ability of fruit digests to reduce hydrogen peroxide-induced oxidative stress in Caco-2 cells. *Food Chemistry*, 227, 404–412.
- Li, G., Long, X., Pan, Y., Zhao, X., & Song, J. Le. (2018). Study on soybean milk fermented by *Lactobacillus plantarum* YS-1 reduced the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative damage in Caco-2 cells. *Biomedical Research (India)*, 29(2), 357–364.
- Li, Y.W.; Li, B. (2013) Characterization of structure-antioxidant activity relationship of peptides in free radical systems using QSAR models: Key sequence positions and their amino acid properties. *J. Theor. Biol.* 318, 29–43.

- Lin, H. M., Deng, S. - G., & Huang, S. - B. (2014). Antioxidant activities of ferrous - chelating peptides isolated from five types of low - value fish protein hydrolysates. *Journal of Food Biochemistry*, 38, 627-633.
- Liu, R. H., & Finley, J. (2005). Potential cell culture models for antioxidant research. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4311-4314.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 4(8), 118.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 4(8), 118.
- Loewus F.A. (1951). Improvement in anthrone method for determination of carbohydrates. *Anal. Chem.*; 24: 219.
- López-Alarcón, C., & Denicola, A. (2013). Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. *Analytica Chimica Acta*, 763, 1-10.
- Lopez-Amoros, R., Comas, J., & Vives-Rego, J. (1995). Flow cytometric assessment of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* starvation-survival in seawater using rhodamine 123, propidium iodide, and oxonol. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(7), 2521-2526.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951) "Protein measurement with the Folin phenol reagent." *Journal Biological Chemistry*, 193: 265-275.
- Lu, S., Deng, P., Liu, X., Luo, J., Han, R., Gu, X., Liang, S., Wang, X., Li, F., Lozanov, V., Patthy, A. & Pongor, S. (1999) "Solution structure of the major  $\alpha$ - amylase inhibitor of the crop plant amaranth." *The Journal of Biological Chemistry*, 274 (29): 20473-20478.
- Lu, X., Zhang, L., Sun, Q., Song, G., & Huang, J. (2019). Extraction, identification and structure-activity relationship of antioxidant peptides from sesame (*Sesamum indicum* L.) protein hydrolysate. *Food Research International*, 116, 707-716.
- Ma, Y., Xiong, Y., Zhai, J., Zhu, H. & Dziubla, T. (2010). Fractionation and evaluation of radical scavenging peptides from in vitro digests of buckwheat protein. *Food Chemistry*, 118: 582-588.
- Magdeldin, S., Yoshida, Y., Li, H., Maeda, Y., Yokoyama, M., Enany, S., Zhang, Y., Xu, B., Fujinaka, H., Yaoita, E., Sasaki, S., Yamamoto, T. (2012). Murine colon proteome and characterization of the protein pathways. *BioData Mining*, 5, 11 -14.
- Madadlou, A., O'Sullivan, S., & Sheehan, D. (2010). Fast Protein Liquid Chromatography. In *Protein Chromatography* 681, 439-447.
- Marcone, M. (1999). Biochemical and biophysical properties of plant storage proteins: a current understanding with emphasis on 11S globulins. *Food Research International*, 32: 79-92.
- Marcone, M. F; Niekamp, F. K.; Le Maguer, M. y Yada R. Y. (1994). Purification and characterization of the physicochemical properties of the albumin fraction from the seeds of *Amaranthus hypochondriacus*. *Food Chemistry*.; 51:287-294.
- Marcone, M. F. & Yada, R. Y. (1991). Isolation, purification and characterization of the oligomeric seed globulin from *Amaranthus hypochondriacus*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 55 (9) :2281-2289.
- Marcone, M. F. & Yada, R. Y. (1998). Structural analysis of globulins isolated from genetically different *Amaranth* hybrid lines. *Food Chemistry*, 61 (3) :319-326.



- Martin, K. R., Failla, M. L., & Smith Jr., J. C. (1997). Differential susceptibility of CACO-2 and HEPG2 human cell lines to oxidative stress. *Journal of the Elisha Mitchell Scientific Society*.
- Martínez, E. N. & Añón, M.C. (1996). Composition and Structural Characterization of Amaranth Protein Isolates. An Electrophoretic and Calorimetric Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44: 2523-2530.
- Martínez, E. N., Castellani, O. F. & Añón, M. C. (1997). Common molecular features among amaranth storage proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45: 3832-3839.
- Martínez, K. D., Martínez, J. H., dos Santos Ferreira, C., del Pilar Buera, M., Pérez, O. E., Paula Domínguez Rubio, A., ... Velázquez, F. (2018). Betanin loaded nanocarriers based on quinoa seed 11S globulin. Impact on the protein structure and antioxidant activity. *Food Hydrocolloids*, 87, 880–890.
- Martínez-maqueda, D., Miralles, B., & Recio, I. (2015). Chapter 11. HT29 Cell Line. In *The Impact of Food Bioactives on Health* (pp. 113–124).
- Marzorati, M., Verhelst, A., Luta, G., Sinnott, R., Verstraete, W., de Wiele, T. V., & Possemiers, S. (2010). In vitro modulation of the human gastrointestinal microbial community by plant-derived polysaccharide-rich dietary supplements. *International Journal of Food Microbiology*, 139(3), 168–176.
- Melov, S. (2002). Animal models of oxidative stress, aging, and therapeutic antioxidant interventions. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 34(11), 1395–1400.
- Ménard, O., Cattenoz, T., Guillemin, H., Souchon, I., Deglaire, A., Dupont, D., & Picque, D. (2014). Validation of a new in vitro dynamic system to simulate infant digestion. *Food Chemistry*, 145, 1039–1045.
- Mendis, E., Kim, M. M., Rajapakse, N., & Kim, S. K. (2007). An in vitro cellular analysis of the radical scavenging efficacy of chitooligosaccharides. *Life Sciences*, 80(23), 2118–2127.
- Mikhed, Y., Daiber, A., & Steven, S. (2015). Mitochondrial Oxidative Stress , Mitochondrial DNA Damage and Their Role in Age-Related Vascular Dysfunction, 15918–15953.
- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., ... Brodkorb, A. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food - an international consensus. Supplementary Material. *Royal Society of Chemistry Food & Function*, 5(6), SS1-9.
- Minekus, M., Marteau, P., Havenaar, R., & Huis in 't Veld, J. H. J. (1995). A multicompartmental dynamic computer-controlled model simulating the stomach and small intestine. *Alternatives to Laboratory Animals*, 23(August 2015), 197–209.
- Miyamoto, Y., Koh, Y. H., Park, Y. S., Fujiwara, N., Sakiyama, H., Misonou, Y., ... Taniguchi, N. (2003). Oxidative stress caused by inactivation of glutathione peroxidase and adaptive responses. *Biological Chemistry*, 384(4), 567–574.
- Mohan-Kumari, H. P., Dhale, M. A., Akhilender Naidu, K., & Vijayalakshmi, G. (2011). Antioxidant effect of red mould rice in hypercholesterolemic Wistar male rats. *Cell Biochemistry and Function*, 29(7), 597–602.
- Molina, M. I., Circosta, A., Añón, M. C. & Petruccelli, S. (2008) Mature *Amaranthus hypochondriacus* seeds contain non-processed 11S precursors. *Phytochemistry*, 69: 58-65.

- Montoya-Rodriguez A, Gomez-Favela M, Reyes-Moreno C, Millan-Carrillo J y González E (2015). Identification of Bioactive Peptide Sequences from Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) Seed Proteins and Their Potential Role in the Prevention of Chronic Diseases. *Compr. Rev.* 14, 139-158.
- Mora-Escobedo, R., Paredes-López, O. & Odorica-Falomir, C.(1990). Characterization of albumins and globulins from Amaranth. *LWT- Food Science and Technology*, 23: 484-487.
- Mora H, Á. C., Aragón N, D. M., & Ospina G, L. F. (2009). Caracterización del estrés oxidativo en ratas Wistar diabéticas por estreptozotocina. *Vitae*, 16(3), 311–319.
- Moreda-Piñeiro, J., Moreda-Piñeiro, A., Romarís-Hortas, V., Moscoso-Pérez, C., López-Mahía, P., Muniategui-Lorenzo, S., ... Prada-Rodríguez, D. (2011). In-vivo and in-vitro testing to assess the bioaccessibility and the bioavailability of arsenic, selenium and mercury species in food samples. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 30(2), 324–345.
- Mytilineou, C., Kramer, B. C., & Yabut, J. A. (2002). Glutathione depletion and oxidative stress. *Parkinsonism and Related Disorders*, 8(6), 385–387..
- Nair, V., & Turner, G. A. (1984). The Thiobarbituric Acid Test for Lipid Peroxidation : Structure of the Adduct with Malondialdehyde. *Lipids*, 19(10).
- Nakamura, R., Konishi, Y., Kojima, A. & Nakatani, N. (1998). Globulin and albumin-2 associated with protein bodies in *Amaranthus cruentus* seeds. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 62 (6): 1231-1233.
- Nazeer R. A., Kumar N. S. S., Ganesh R. J. (2012). In vitro and in vivo studies on the antioxidant activity of fish peptide isolated from the croaker (*Otolithes ruber*) muscle protein hydrolysate. *Peptides* 35(2): 261–268.
- Niki, E. (1990). Free radical initiators as source of water- or lipid-soluble peroxy radicals. *Methods in Enzymology*, 186(C), 100–108. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86095-D](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86095-D)
- Niki, E. (2010). Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo. *Free Radical Biology and Medicine*, 49(4), 503–515.
- Niki, E., Komuro, E., Takahashi, M., Uranoz, S., Itos, E., & Teraoe, K. (1988). Oxidative Hemolysis of Erythrocytes and Its Inhibition by Free Radical Scavengers, 263(36), 19809–19814.
- Nkonge Ch., Ballance M. (1982) A sensitive colorimetric procedure for nitrogen determination in micro-Kjeldahl digests. *J. Agric. Food Chem.*; 30: 416-420.
- Noeman, S. A., Hamooda, H. E., & Baalash, A. A. (2011). Biochemical Study of Oxidative Stress Markers in the Liver, Kidney and Heart of High Fat Diet Induced Obesity in Rats. *Diabetology & Metabolic Syndrome*, 3(1), 17.
- Nsimba, R. Y., Kikuzaki, H. & Konishi Y. (2008). Antioxidant activity of various extracts and fractions of *Chenopodium quinoa* and *Amaranthus* spp. Seeds. *Food Chemistry*, 106: 760-766.
- Nwachukwu, I. D.; Aluko, R. E. (2019) Structural and Functional Properties of Food Protein-Derived Antioxidant Peptides. *J. Food Biochem.* 43 (1), e12761.
- OMS. (2003). Dieta, nutrición y prevención de enfermedades crónicas. Serie de Informes Técnicos, 1–152.
- Orsini Delgado, M.C., Galleano, M., Añón, M. C., & Tironi, V. A. (2015). Amaranth Peptides from Simulated Gastrointestinal Digestion: Antioxidant Activity against Reactive Species. *Plant Foods for Human Nutrition*, 70(1), 27–34.

- Orsini Delgado, M. C., Nardo, A., Pavlovic, M., Rogniaux, H., Añón, M. C., & Tironi, V. A. (2016). Identification and characterization of antioxidant peptides obtained by gastrointestinal digestion of amaranth proteins. *Food Chemistry*, 197, 1160–1167.
- Orsini Delgado, M. C., Tironi, V. A., & Añón, M. C. (2011). Antioxidant activity of amaranth protein or their hydrolysates under simulated gastrointestinal digestion. *LWT Food Science and Technology*, 44(8), 1752–1760.
- Orsini Delgado, M. C., Añón, M., & Tironi, V. (2016). Péptidos antioxidantes derivados de la digestión gastrointestinal de proteínas de amaranto : Una primera aproximación a la evaluación de su absorción intestinal y posterior actividad Antioxidant peptides from gastrointestinal digestion of amaranth protein. *Revista Del Laboratorio Tecnológico Del Uruguay*, 11, 18–26.
- Ott, M., Gogvadze, V., Orrenius, S., & Zhivotovsky, B. (2007). Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis*, 12(5), 913–922.
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M. & Prior, R. (2001) "Development and validation of an improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay using fluorescein as the fluorescent probe." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 4619-4626.
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J., Deemer, E., Prior, R. & Huang, D. (2002) "Novel fluorometric assay for hydroxyl radical prevention capacity using fluorescein as the probe." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 2772-2777.
- Pandey, K. B., & Rizvi, S. I. (2011). Biomarkers of oxidative stress in red blood cells BIOMARKERS OF OXIDATIVE STRESS IN RED BLOOD CELLS Kanti Bhooshan Pandey , Syed Ibrahim Rizvi \*, (January 2015).
- Pappenheimer, J. R., Dahl, C. E., Karnovsky, M. L., & Maggio, J. E. (1994). Intestinal absorption and excretion of octapeptides composed of D amino acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(5), 1942–1945.
- Parameshwaran, K., Irwin, M. H., Steliou, K., & Pinkert, C. A. (2010). <scp>D</scp> -Galactose Effectiveness in Modeling Aging and Therapeutic Antioxidant Treatment in Mice. *Rejuvenation Research*, 13(6), 729–735.
- Paredes-López, O., Mendoza, V. & Mora R. (1993). Isolation of amaranth flour proteins by fractionation procedures and sonication. *Plant Food for Human Nutrition*, 43: 37-43.
- Peskin, A. V., & Winterbourn, C. C. (2000). A microtiter plate assay for superoxide dismutase using a water-soluble tetrazolium salt (WST-1). *Clinica Chimica Acta*, 293(1–2), 157–166.
- Piechota-Polanczyk, A., & Fichna, J. (2014). The role of oxidative stress in pathogenesis and treatment of inflammatory bowel diseases. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 387(7), 605–620.
- Pinent, M., Castell-Auví, A., Genovese, M. I., Serrano, J., Casanova, A., Blay, M., & Ardévol, A. (2016). Antioxidant effects of proanthocyanidin-rich natural extracts from grape seed and cupuassu on gastrointestinal mucosa. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(1), 178–182.
- Phongthai, S., D' Amico, S., Schoenlechner, R., Homthawornchoo, W., & Rawdkuen, S. (2018). Fractionation and antioxidant properties of rice bran protein hydrolysates stimulated by in vitro gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, 240, 156–164.
- Plate, A. & Arêas, J. (2002) "Cholesterol-lowering effect of extruded amaranth (*Amaranthus caudatus* L.) in hypercholesterolemic rabbits." *Food Chemistry*, 76.

- Pownall, T. L., Udenigwe, C. C., & Aluko, R. E. (2010). Amino acid composition and antioxidant properties of pea seed (*Pisum sativum* L.) enzymatic protein hydrolysate fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 4712–4718.
- Prasad K, Kalra J (1989) Experimental atherosclerosis and oxygen free radicals. *Angiology* 40:835–843
- Pryor, W. A. (1997). Cigarette smoke radicals and the role of free radicals in chemical carcinogenicity. *Environmental Health Perspectives*, 105(SUPPL. 4), 875–882.
- Querobino, S. M., Ribeiro, C. A. J., & Alberto-Silva, C. (2018). Bradykinin-potentiating PEPTIDE-10C, an argininosuccinate synthetase activator, protects against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Peptides*, 103(January), 90–97.
- Quiroga, A. V., Aphalo, P., Nardo, A. E., & Añón, M. C. (2017). In Vitro Modulation of Renin-Angiotensin System Enzymes by Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) Protein-Derived Peptides: Alternative Mechanisms Different from ACE Inhibition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(34), 7415–7423.
- Radi, R., Turrens, J. F., Chang, L. Y., Bush, K. M., Crapo, J. D., & Freeman, B. A. (1991). Detection of catalase in rat heart mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 266(32), 22028–22034.
- Ramana, B. V., Kumar, V. V., Krishna, P. N. R., Kumar, C. S., Reddy, P. U. M., & Raju, T. N. (2006). Effect of quercetin on galactose-induced hyperglycaemic oxidative stress in hepatic and neuronal tissues of Wistar rats. *Acta Diabetologica*, 43(4), 135–141.
- Reeves, P. G., Nielsen, F. H., & Fahey, G. C. (1993). AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. *The Journal of Nutrition*, 123(11), 1939–1951.
- Regazzo, D., Mollé, D., Gabai, G., Tomé, D., Dupont, D., Leonil, J., & Boutrou, R. (2010). The (193-209) 17-residues peptide of bovine  $\beta$ -casein is transported through Caco-2 monolayer. *Molecular Nutrition & Food Research*, 54(10), 1428–1435.
- Ren, J.; Zhao, M.; Shi, J.; Wang, J.; Jiang, Y.; Cui, C.; Kakuda, Y.; Xue, S.J. (2008) Purification and identification of antioxidant peptides from grass carp muscle hydrolysates by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. *Food Chem.* 108, 727–736.
- Riccardi, C., & Nicoletti, I. (2006). Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nature Protocols*.
- Rivas-Arancibia, S., Guevara-Guzmán, R., López-Vidal, Y., Rodríguez-Martínez, E., Zanardo-Gomes, M., Angoa-Pérez, M., & Raisman-Vozari, R. (2009). Oxidative stress caused by ozone exposure induces loss of brain repair in the hippocampus of adult rats. *Toxicological Sciences*, 113(1), 187–197.
- Roberfroid, M. B. (1999). What is beneficial for health? The concept of functional food. *Food and Chemical Toxicology*, 37(9–10), 1039–1041.
- Robinett, N. G., Peterson, R. L., & Culotta, V. C. (2018). Eukaryotic copper-only superoxide dismutases (SODs): A new class of SOD enzymes and SOD-like protein domains. *Journal of Biological Chemistry*, 293(13), 4636–4643.
- Romero-Zepeda, H. y Paredes-López O. (1996). Isolation and characterization of amarantin, the 11S amaranth seed globulin. *Journal Food Chemistry*, 19:329-339

- Rush, G. F., Gorski, J. R., Ripple, M. G., Sowinski, J., Bugelski, P., & Hewitt, W. R. (1985). Organic hydroperoxide-induced lipid peroxidation and cell death in isolated hepatocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 78(3), 473–483.
- Rutherford-Markwick, K. J., & Moughan, P. J. (2005). Bioactive peptides derived from food. *Journal of AOAC International*, 88(3), 955–966.
- Ryu, B., Himaya, S. W. A., Qian, Z. J., Lee, S. H., & Kim, S. K. (2011). Prevention of hydrogen peroxide-induced oxidative stress in HDF cells by peptides derived from seaweed pipefish, *Syngnathus schlegeli*. *Peptides*, 32(4), 639–647.
- Sabbione, A. C., Nardo, A. E., Añón, M. C., & Scilingo, A. (2016). Amaranth peptides with antithrombotic activity released by simulated gastrointestinal digestion. *Journal of Functional Foods*, 20, 204–214.
- Sacanelles Salceda, R. (2008). PEROXISOMAS: ORGANELOS POLIFACÉTICOS Redalyc Sistema de Información Científica Universidad Nacional Autónoma de México México. *Revista de Educación Bioquímica*, 27, 85–92.
- Salvi, M., Battaglia, V., Brunati, A. M., La Rocca, N., Rossi, C. A., Marcocci, L.,... Tibaldi, E. (2007). Catalase Takes Part in Rat Liver Mitochondria Oxidative Stress Defense. *Journal of Biological Chemistry*, 282(33), 24407–24415.
- Samaranayaka, A. G. P., Kitts, D. D., & Li-Chan, E. C. Y. (2010). Antioxidative and angiotensin-I-converting enzyme inhibitory potential of a pacific hake (*Merluccius productus*) fish protein hydrolysate subjected to simulated gastrointestinal digestion and caco-2 cell permeation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(3), 1535–1542.
- Sánchez-Rivera, L., Ménard, O., Recio, I., & Dupont, D. (2015). Peptide mapping during dynamic gastric digestion of heated and unheated skimmed milk powder. *Food Research International*, 77, 132–139.
- Santo, A., Zhu, H., & Li, Y. R. (2016). Free Radicals: From Health to Disease. *Reactive Oxygen Species*, 2(4), 28–33.
- Scandalios, J. G. (2004). Genomic Responses to Oxidative Stress Keywords.
- Schägger, H. (2006). Tricine–SDS-PAGE. *Nature Protocols* 1: 16–22.
- Schrader, M., & Fahimi, H. D. (2006). Peroxisomes and oxidative stress, 1763, 1755–1766.
- Segura-Nieto, M., Barba de la Rosa, A. & Paredes-López, O. (1994). Biochemistry of amaranth proteins. *Amaranth: Biology, Chemistry & Technology*, Ed. CRC Press. Boca Raton(5): 75-106.
- Segura-Nieto, M., Vázquez-Sánchez, N., Rubio-Velázquez, H., Olguin-Martínez, H., Rodríguez-Nester, C. E. & Herrera-Estrella L. (1992). Characterization of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) seed proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40 (9): 1553-1558.
- Sengupta, P. (2011). A Scientific Review of Age Determination for a Laboratory Rat: How Old is it in Comparison with Human Age? *Biomedicine International* 2011; 2, 81–89.
- Sharifzadeh, M., Ranjbar, A., Hosseini, A., & Khanavi, M. (2017). The effect of green tea extract on oxidative stress and spatial learning in streptozotocin-diabetic rats. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 16(1), 201–209.
- Shokolenko, I., Venediktova, N., Bochkareva, A., Wilson, G. L., & Alexeyev, M. F. (2009). Oxidative stress induces degradation of mitochondrial DNA, 37(8), 2539–2548.

- Son M, Ko JI, Kim WB, Jang HK, Kim BK (1998) Taurine can ameliorate inflammatory bowel disease in rats. *Adv Exp Med Biol* 442:291–298.
- Song, J. Le, & Gao, Y. (2014). Effects of methanolic extract form Fuzhuan brick-tea on hydrogen peroxide-induced oxidative stress in human intestinal epithelial adenocarcinoma Caco-2 cells. *Molecular Medicine Reports*, 9(3), 1061–1067.
- Stoscheck, C. M. (1990) "Quantitation of protein." *Methods in Enzymology*, 182: 894.
- Stothard P (2000) The Sequence Manipulation Suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *Biotechniques* 28:1102-1104.
- Suárez, S., & Añón, M. C. (2019). Amaranth proteins emulsions as delivery system of Angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides. *Food Hydrocolloids*, 90(September 2018), 154–161.
- Sudhahar, V., Kumar, S. A., & Varalakshmi, P. (2006). Role of lupeol and lupeol linoleate on lipemic-oxidative stress in experimental hypercholesterolemia. *Life Sciences*, 78(12), 1329–1335.
- Sun, C., Wu, W., Yin, Z., Fan, L., Ma, Y., Lai, F., & Wu, H. (2018). Effects of simulated gastrointestinal digestion on the physicochemical properties, erythrocyte haemolysis inhibitory ability and chemical antioxidant activity of mulberry leaf protein and its hydrolysates. *International Journal of Food Science & Technology*, 53, 282–295.
- Szkudelski, T. (2001). The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiological Research*, 50(6), 537–546.
- Tsai C (1975) Lipid peroxidation and glutathione peroxidase activity in the liver of cholesterol-fed rats. *J Nutr* 105:946–951
- Taha, R., Seidman, E., Mailhot, G., Boudreau, F., Gendron, F. P., Beaulieu, J. F., ... Levy, E. (2010). Oxidative stress and mitochondrial functions in the intestinal Caco-2/15 Cell Line. *PLoS ONE*, 5(7).
- Takayama, C., de-Faria, F. M., de Almeida, A. C. A., Dunder, R. J., Manzo, L. P., Socca, E. A. R., Luiz-Ferreira, A. (2016). Chemical composition of *Rosmarinus officinalis* essential oil and antioxidant action against gastric damage induced by absolute ethanol in the rat. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(8), 677–681.
- Tanaka, K. ichi, Ogawa, N., & Asanuma, M. (2006). Molecular basis of 6-hydroxydopamine-induced caspase activations due to increases in oxidative stress in the mouse striatum. *Neuroscience Letters*, 410(2), 85–89.
- Tharakan, A., Norton, I. T., Fryer, P. J., & Bakalis, S. (2010). Mass transfer and nutrient absorption in a simulated model of small intestine. *Journal of Food Science*, 75(6).
- Tironi, V. A. (2005) "Rancidez oxidativa en salmón de mar (*Pseudoperca semifasciata*). Interacción lípidos oxidados – proteínas." Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires, Argentina.
- Tironi, V. A. & Añón, M. C. (2010). "Amaranth as a source of antioxidant peptides. Effect of proteolysis." *Food Research International*, 43: 315 – 322.
- Torres-Fuentes, C., Contreras, M. D. M., Recio, I., Alaiz, M., & Vioque, J. (2015). Identification and characterization of antioxidant peptides from chickpea protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 180, 194–202.

- Turco, L., Catone, T., Caloni, F., Consiglio, E. Di, Testai, E., & Stamatii, A. (2011). Caco-2/TC7 cell line characterization for intestinal absorption: How reliable is this in vitro model for the prediction of the oral dose fraction absorbed in human? *Toxicology in Vitro*, 25(1), 13–20.
- Udenigwe, C. C. & Aluko, R. E. (2012) "Food Protein-Derived Bioactive Peptides: Production, Processing and Potencial Health Benefits." *Journal of Food Science*, 71: 11-24.
- Ussing, H. H., & Zerahan, K. (1950). Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta Physiologica Scandinavica*, 23, 110–127.
- Uysal, O., Sevimli, T., Sevimli, M., & Gunes, S. (2018). *Cell and Tissue Culture : The Base of Biotechnology. Omics Technologies and Bio-engineering Volume 1*. Elsevier Inc.
- Valenzuela B., A., Valenzuela, R., Sanhueza, J., & Morales I., G. (2014). Alimentos funcionales, nutraceuticos y FOSHU: ¿Vamos hacia un nuevo concepto de alimentación? *Revista Chilena de Nutrición.*, 41(4).
- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., & Mazur, M. (2006). Free radicals , metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer, 160, 1–40.
- Vargas-Robles, H., Rios, A., Arellano-Mendoza, M., Escalante, B. A., & Schnoor, M. (2015). Antioxidative diet supplementation reverses high-fat diet-induced increases of cardiovascular risk factors in mice. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.
- Vecchi, B. & Añón, M.C. (2009). Two novel antihypertensive tetrapeptides from *Amaranthus Hypochondriacus* 11S globulin. *Pytochemistry*, 70: 864-870.
- Verhoeckx, K., Cotter, P., López-Expósito, I., Kleiveland, C., Lea, T., Mackie, A., Requena, T., Swiatecka, D., Wichers, H. (2015). The Impact of Food Bioactives on Health: In Vitro and Ex Vivo Models. *The Impact of Food Bioactives on Health: In Vitro and Ex Vivo Models*.
- Verma, A. (2014). *Animal Tissue Culture : Principles and Applications. Animal Biotechnology: Models in Discovery and Translation*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416002-6.00012-2>.
- Venskutonis, P and Kraujalis, P (2013). Nutritional Components of Amaranth Seeds and Vegetables: A Review on Composition, Properties, and Uses. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 12, 381-412.
- Vermeirssen, V., Van Camp, J., Devos, L., & Verstraete, W. (2003). Release of angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity during in vitro gastrointestinal digestion: From batch experiment to semicontinuous model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(19), 5680
- Videla, Luis & Obregón Rivas, Ana & Pettinelli, Paulina. (2011). Patología de hígado graso no-alcohólico (HGNA) asociada a obesidad: mecanismos patogénicos. *Medwave*. 11. 10.5867/medwave.2011.07.5068.
- Wang, B., & Li, B. (2017). Effect of molecular weight on the transepithelial transport and peptidase degradation of casein-derived peptides by using Caco-2 cell model. *Food Chemistry*, 218, 1–8.
- Wang, C. J., Wang, J. M., Lin, W. L., Chu, C. Y., Chou, F. P., & Tseng, T. H. (2000). Protective effect of Hibiscus anthocyanins against tert-butyl hydroperoxide-induced hepatic toxicity in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 38(5), 411–416.
- Wang, D., Wang, L. jun, Zhu, F. xue, Zhu, J. ye, Chen, X. D., Zou, L., ... Li, L. te. (2008). In vitro and in vivo studies on the antioxidant activities of the aqueous extracts of Douchi (a traditional Chinese salt-fermented soybean food). *Food Chemistry*, 107(4), 1421–1428.

- Wang, L., Ding, L., Wang, Y., Zhang, Y., & Liu, J. (2015). Isolation and characterization of in vitro and cellular free radical scavenging peptides from corn peptide fractions. *Molecules*, 20(2), 3221–3237. <https://doi.org/10.3390/molecules20023221>.
- Wang, N., Han, Q., Wang, G., Ma, W. P., Wang, J., Wu, W. X., ... Jiang, H. Q. (2016). Resveratrol Protects Oxidative Stress-Induced Intestinal Epithelial Barrier Dysfunction by Upregulating Heme Oxygenase-1 Expression. *Digestive Diseases and Sciences*, 61(9), 2522–2534.
- Wichansawakun, S., & Buttar, H. S. (2019). Chapter 32. Antioxidant Diets and Functional Foods Promote Healthy Aging and Longevity Through Diverse Mechanisms of Action. *The Role of Functional Food Security in Global Health*. Elsevier Inc.
- Wickham, M. J. S., Faulks, R. M., Mann, J., & Mandalari, G. (2012). The design, operation, and application of a dynamic gastric model. *Dissolution Technologies*, 19(3), 15–22.
- Wickham, M., Faulks, R., & Mills, C. (2009). In vitro digestion methods for assessing the effect of food structure on allergen breakdown. *Molecular Nutrition and Food Research*, 53(8), 952–958.
- Wijeratne, S. S. K., & Cuppett, S. L. (2006). Hydrogen hydroperoxide induced oxidative stress damage and antioxidant enzyme response in Caco-2 human colon cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(12), 4476–4481.
- Winckler, Jana. (1974). Vital staining of lysosomes and other cell organelles of the rat with neutral red. *Progress in histochemistry and cytochemistry*. 6. 1-91.
- Wiseman, H., O'Reilly, J. D., Adlercreutz, H., Mallet, A. I., Bowey, E. A., Rowland, I. R., & Sanders, T. A. B. (2000). Isoflavone phytoestrogens consumed in soy decrease F2-isoprostane concentrations and increase resistance of low-density lipoprotein to oxidation in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, 72(2), 395–400.
- Wolf, K. L., & Liu, R. H. (2007). Cellular Antioxidant Activity (CAA) Assay for Assessing Antioxidants, Foods, and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(22), 8896–8907.
- Wu, J., Huo, J., Huang, M., Zhao, M., Luo, X., & Sun, B. (2017). Structural Characterization of a Tetrapeptide from Sesame Flavor-Type Baijiu and Its Preventive Effects against AAPH-Induced Oxidative Stress in HepG2 Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(48), 10495–10504.
- Xie, N., Liu, S., Wang, C., & Li, B. (2014). Stability of casein antioxidant peptide fractions during in vitro digestion/Caco-2 cell model: characteristics of the resistant peptides. *European Food Research and Technology*, 239(4), 577–586.
- Xu, B., & Chang, S. K. C. (2010). Phenolic substance characterization and chemical and cell-Based antioxidant activities of 11 lentils grown in the Northern United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(3), 1509–1517.
- Xu, F., Wang, L., Ju, X., Zhang, J., Yin, S., Shi, J., ... Yuan, Q. (2017). Transepithelial Transport of YWDHNNPQIR and Its Metabolic Fate with Cytoprotection against Oxidative Stress in Human Intestinal Caco-2 Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(10), 2056–2065.
- Yagi, K. (1976). A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochemical Medicine*, 15(2), 212–216.
- Yamashita, S., Tanaka, Y., Endoh, Y., Taki, Y., Sakane, T., Nadai, T., & Sezaki, H. (1997). 1997\_Analysis of drug permeation across Caco-2 monolayer.pdf. *Pharmaceutical Research*, 14, 486–491.



- Yang, B., Du, S., Lu, Y., Jia, S., Zhao, M., Bai, J., Wu, H. (2018). Influence of paeoniflorin and menthol on puerarin transport across MDCK and MDCK-MDR1 cells as blood–brain barrier in vitro model. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 70(3), 349–360.
- Yang, H., & Lee, T. (2015). Antioxidant enzymes as redox-based biomarkers : a brief review, 48(4), 200–208.
- Yarnpakdee, S., Benjakul, S., Kristinsson, H. G., & Bakken, H. E. (2015). Preventive effect of Nile tilapia hydrolysate against oxidative damage of HepG2 cells and DNA mediated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and AAPH. *Journal of Food Science and Technology*, 52(10), 6194–6205.
- Yihong, Q., Yisheng, C., & Zhang, G. (2009). Devolving solid oral dosage forms. *Pharmaceutical theory and practice (Elsevier I). USA*.
- Yoshida, Y., Umeno, A., & Shichiri, M. (2013). Lipid peroxidation biomarkers for evaluating oxidative stress and assessing antioxidant capacity in vivo, 52(1), 9–16. <https://doi.org/10.3164/jcbn.12>
- Yousr, M., Alogbi, A., Omar, U., & Howell, N. K. (2016). Antioxidant Effect of Egg Yolk Peptides against Tert-butyl Hydroperoxide Induced Oxidative Stress in Caco-2 Colon Cancer Cells, 4(3), 36–41. <https://doi.org/10.13189/fst.2016.040302>.
- Zbarsky, V., Datla, K. P., Parkar, S., Rai, D. K., Aruoma, O. I., & Dexter, D. T. (2005). Neuroprotective properties of the natural phenolic antioxidants curcumin and naringenin but not quercetin and fisetin in a 6-OHDA model of Parkinson's disease. *Free Radical Research*, 39(10), 1119–1125.
- Zhang, H., Yin, M., Huang, L., Wang, J., Gong, L., Liu, J., & Sun, B. (2017). Evaluation of the Cellular and Animal Models for the Study of Antioxidant Activity: A Review. *Journal of Food Science*, 82(2), 278–288.
- Zhou, K., Caning, C. & Sun, S. (2013). Effects of rice protein hydrolysates prepared by microbial proteases and ultrafiltration on free radicals and meat lipid oxidation. *LWT- Food Science and Technology*, 50: 331-335.
- Zhu, L., Wang, P., Qin, Q. L., Zhang, H., & Wu, Y. J. (2013). Protective effect of polypeptides from larva of housefly (*Musca domestica*) on hydrogen peroxide-induced oxidative damage in HepG2 cells. *Food and Chemical Toxicology*, 60, 385–390.
- Zou, T. Bin; He, T. P.; Li, H. Bin; Tang, H. W.; Xia, E. Q. (2016) The Structure-Activity Relationship of the Antioxidant Peptides from Natural Proteins. *Molecules*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute January 12, 2016, p 72.